

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLAUDIA MARTINS BRAGA GOMES TORRES

**INVESTIGAÇÃO DO GENE *BEST1* EM PACIENTES
COM DISTROFIA MACULAR VITELIFORME**

CURITIBA
2015

ANA CLAUDIA MARTINS BRAGA GOMES TORRES

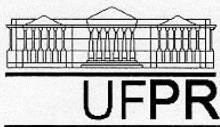
**INVESTIGAÇÃO DO GENE *BEST1* EM PACIENTES
COM DISTROFIA MACULAR VITELIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof. Dr^a Maria da Graça Bicalho

Co-orientadores: Prof. Dr. Mario Teruo Sato
Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos

CURITIBA
2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ANA CLAUDIA BRAGA GOMES TORRES**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de março de 2015

Doutor Fernando César Abib
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Nina Amália Brancia Pagnan
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Maria da Graça Bicalho
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof^º Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matrícula 176702

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Ao meu esposo Max e ao meu filho Matheus.

Aos meus pais, Cláudia e Nei e irmãos Rafael e Daniel.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que deu possibilidades para que esse trabalho fosse realizado.

À minha orientadora Maria da Graça Bicalho pela oportunidade da realização deste trabalho e pela ajuda em todas as etapas e pela amizade.

À Pablo Carvalho Santos, pelo acompanhamento desde o início, pelas reuniões via Skype e pelo auxílio no andamento deste trabalho.

Aos meus pais que foram os meus maiores incentivadores, e que ao longo da vida me ensinaram que o bem mais precioso que alguém pode ter é o conhecimento.
Aos meus irmãos, Rafael e Daniel que mesmo estando longe sempre me apoiaram.
A toda minha família! Amo vocês.

Ao meu esposo Max e ao meu filho Matheus, pela paciência, pelo companheirismo, pela compreensão nos momentos de ausência e pela ajuda sempre quando precisei.
Vocês são minha vida.

Aos meus sogros, principalmente a minha sogra Neudete pelo apoio e ajuda em todos os momentos.

À minha fiel companheira de caminhada Juliana Scharen, obrigada por toda ajuda, conselhos, pelas risadas e a presença nas horas de desespero. Você é uma grande amiga. Obrigada por tudo!

A todos os queridos amigos do LIGH, ao José Samuel, Renata e Geórgia que me ajudaram muito na execução, muito obrigada! Ao restante da equipe: Alessandro, Joandre e Paulo, pela ajuda nas práticas laboratoriais. Às queridas Gorete, Suelen, Michele, Sonia e Marisa pelos momentos de descontração. Agradeço imensamente a todos.

Ao Dr. Mário Sato e especialmente ao Dr. Naoye Shiokawa pela ajuda nas coletas e no entendimento sobre as doenças oftalmológicas, pelo incentivo em todas as etapas deste projeto.

Aos professores do Departamento de Genética especialmente a Lupe, Nina e Daniele Malheiros, pelos ensinamentos e pela atenção que sempre me receberam.

À Carolina Camargo, que me acompanhou de perto e me auxiliou sempre quando precisei. Obrigada pelo ombro amigo Carol!

Aos queridos amigos da pós-graduação: Vanessa, Lorena, Aliandra, William, Talita e Luciane. Levarei vocês para sempre no meu coração. Ao Murilo da secretaria do departamento que sempre se mostrou solícito no que fosse preciso.

Aos pacientes, sem eles nada seria possível.

Ao convênio FUNPAR-LIGH pelo financiamento deste projeto.

À CAPES pela bolsa concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

A Distrofia Macular Viteliforme Best (DMVB) é uma distrofia macular autossômica dominante que apresenta variabilidade de expressão e penetrância incompleta. Esta doença é caracterizada pelo acúmulo de material amarelado na mácula, ocasiona uma lesão referida como viteliforme por se apresentar em forma de gema de ovo. Outra característica comum é a diminuída razão entre pico claro/escuro do eletro-oculograma (EOG). O gene *BEST1* tem sido frequentemente associado à doença, localizado no cromossomo 11 (11q12.3) que codifica uma proteína com 585 aminoácidos, bestrofina-1, cuja função provável seja atuar como um canal de Cl^- ativado por cálcio ou modulador da atividade de canal de Ca^{2+} . Entretanto a exata função ainda é motivo de debate. Desde a descoberta do gene em 1998, em torno de 200 mutações foram descritas em pacientes portadores de DMVB e de outros transtornos oculares tais como a vitreocoroideopatia autossômica dominante, distrofia macular viteliforme do adulto, retinose pigmentar e na bestrofinopatia autossômica recessiva. Cerca de 90% das mutações são de sentido trocado, mas foram identificadas também mudança de matriz de leitura e inserções e deleções que não alteram a matriz de leitura do *locus*. Essas mutações no gene *BEST1* fora também identificadas em outros transtornos oculares. No presente trabalho realizou sequenciamento direto de DNA do gene *BEST1* em 9 pacientes e 14 familiares (totalizando 4 famílias não aparentadas). Foram encontradas 4 mutações de sentido trocado em 3 famílias. Na família 1 foram encontradas as mutações Leu134Val e Arg141His; na família 3 foi encontrada a mutação Asp304Asn e na família 4 a mutação Arg218His. Mais estudos serão necessários para esclarecer a relação destas mutações com a DMVB.

Palavras chave: Distrofia macular viteliforme. Bestrofina. Sequenciamento. *BEST1*. Mutações.

ABSTRACT

The Macular Dystrophy Vitelliform Best (DMVB) is an autosomal dominant macular dystrophy with variable expression and incomplete penetrance. It is characterized by the accumulation of yellowish material in the macula, causing lesion known as yolk-like (vitelliform). The reduced ratio of peak light / dark in the electrooculogram (EOG) is another common feature of this condition. The gene responsible for this disease is *BEST1*, which is located on chromosome 11 (11q12.3). It encodes for bestrophin-1, a protein with 585 amino acids, predicted to be an activated Cl⁻ channel or calcium channel modulating activity of Ca²⁺. The exact function of bestrophin-1 remains unconfirmed. Since the discovery of the gene in 1998, around 200 mutations, have been described in patients with DMVB other diseases such as autosomal vitreoretinopathopathy, adult vitelliform macular dystrophy, retinitis pigmentosa and autosomal recessive bestrophinopathy. Around 90%, are missense substitutions. These mutations have been also identified in other diseases such as autosomal dominant vitreoretinopathopathy, adult vitelliform macular dystrophy, retinitis pigmentosa and autosomal recessive bestrophinopathy. Here we sequenced *BEST1* in 9 patients and 14 family members (totaling 4 unrelated families). We found 4 missense mutations in 3 families. In the family 1 were found the mutations Leu134Val and Arg141His; in the family 3 found the mutation Asp304Asn and in family 4 the Arg218His mutation. Further studies will be necessary to clarify the relationship of these mutations with DMVB.

Key words: Macular vitelliform dystrophy. Bestrophin. Sequencing. *BEST1*. Mutations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- ESTRUTURA DA RETINA.....	03
FIGURA 2	- EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DMVB	07
FIGURA 3	- EXEMPLO DE ELETRO-OCULOGRAMA	08
FIGURA 4	- FOTOGRAFIA DE FUNDO DE OLHO DIREITO	09
FIGURA 5	- ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>BEST1</i>	10
FIGURA 6	- ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE <i>BEST1</i> E SEUS TRÊS PRINCIPAIS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS	11
FIGURA 7	- LOCALIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS ALTERADOS AO LONGO DA PROTEÍNA BESTROFINA-1.....	17
FIGURA 8	- MECANISMO POSTULADO PARA O ACÚMULO DA LIPOFUSCINA EM DMVB	23
FIGURA 9	- MODELOS TOPOLÓGICOS DA PROTEÍNA BESTROFINA- 1.....	24
FIGURA 10	- RESULTADO DA CORRIDA ELETROFORÉTICA DO PRODUTO AMPLIFICADO DO ÉXON 10 EM GEL DE AGAROSE 1%.....	31
FIGURA 11	- EXEMPLO DE ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA BESTROFINA EM DIFERENTES ESPÉCIES.....	33
FIGURA 12	- HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 1	36
FIGURA 13	- HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 2.	37
FIGURA 14	- HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 3	38
FIGURA 15	- HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 4	39

LISTA DE TABELAS


TABELA 1	- OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS MUTAÇÕES NO GENE BEST1	12
TABELA 2	- PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NA PROTEÍNA BESTROFINA-1 CODIFICADA PELO GENE BEST1	15
TABELA 3	- SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE BEST1	29
TABELA 4	- REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS 1,3,5,6,7,10 E 11.....	29
TABELA 5	- REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS 4, 8 E 9.....	30
TABELA 6	- CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO	30
TABELA 7	- PURIFICAÇÃO COM EXO/SAP	31
TABELA 8	- CICLOS DE PURIFICAÇÃO	32
TABELA 9	- SEQUENCIAMENTO – ÉXONS 1,3 AO11.	32
TABELA 10	- CICLOS DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	32
TABELA 11	- SNPS, NÚMERO NO dbSNP, LOCALIZAÇÃO, NATUREZA DA MUTAÇÃO, SIGNIFICADO CLÍNICO E FREQUÊNCIA NAS FAMÍLIAS INVESTIGADAS.....	35
TABELA 12	- SNPS E INDEL GENOTIPADOS NA FAMÍLIA 1.	36
TABELA 13	- SNPS E INDEL GENOTIPADOS NA FAMÍLIA 2	37
TABELA 14	- SNPS E INDEL GENOTIPADOS NA FAMÍLIA 3	38
TABELA 15	- SNPS E INDEL GENOTIPADOS NA FAMÍLIA 4	39


LISTA DE SIGLAS

BAR	- Bestrofinopatia Autossômica Recessiva
CaCCs	- <i>Ca²⁺-activated C⁻ channels</i> (Canais de Cloro ativado por Cálcio)
CFTR	- <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística)
CMKII	- <i>Ca²⁺/Calmodulin - dependent protein Kinase II</i> (proteína Quinase II dependente Ca ²⁺ /Calmodulina)
DVM	- Distrofia Viteliforme Multifocal
DMVA	- Distrofia Macular Viteliforme do Adulto
DMVB	- Distrofia Macular Viteliforme de Best
DT	- <i>Dark Though</i> (pico escuro)
DTM	- Domínio Transmembrana
EOG	- Eletro-oculograma
EPR	- Epitélio Pigmentado da Retina
ERG	- Eletrorretinograma
fRPE	- <i>Fetal Retina Pigmented Epithelium</i> (células do Epitélio Pigmentar da Retina de feto humano)
GABA	- <i>Gamma-AminoButyric Acid</i> (Ácido Gama-AminoButírico)
HEK	- <i>Human Embryonic Kidney</i> (Rim Embrionário Humano)
IA	- Índice Arden
iPSC	- <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> (Célula-tronco Pluripotente Induzida)
kb	- Kilo base (1000 pares de base)
LP	- <i>Light Peak</i> (pico claro)
MDCKII	- <i>Madin Darby canine kidney II cells</i> (células II de rim canino Madin Darby)
pb	- Pares de base

PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RCM	- Retinopatia Canina Multifocal
SEF	- Segmento Externo dos Fotorreceptores
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismos de nucleotídeos únicos)
UGB	- Uteroglobulina
VIRCAD	- Vitreoretinocoroideopatia Autossômica Dominante

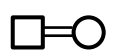
LISTA DE SÍMBOLOS DOS HEREDOGRAMAS


 Indivíduo do sexo masculino

 Indivíduo do sexo feminino

 Afetados

 Heterozigotos

 Casamento consanguíneo

 Indica o probando (pessoa a qual deu origem ao estudo)

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 ESTRUTURA DA RETINA	3
2.2 DISTROFIA MACULAR VITELIFORME DE BEST	5
2.2.1 Histórico	5
2.2.2 Características clínicas.....	6
2.2.3 Eletro-oculograma (EOG).....	8
2.2.4 Acúmulo de lipofuscina.....	8
2.3 GENE <i>BEST1</i>	9
2.3.1 Mutações no gene <i>BEST1</i>	11
2.3.2 Regulação da expressão do gene <i>BEST1</i>	19
2.4 PROTEÍNA BESTROFINA-1.....	20
2.4.1 Topologia da proteína.....	23
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL.....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	28
5.2 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E EXTRAÇÃO DE DNA	28
5.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>BEST1</i>	28
5.3.1 Purificação dos produtos amplificados para sequenciamento	31
5.4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>BEST1</i>	32
5.4.1 Eletroforese de capilar.....	33
5.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	33
6 RESULTADOS	34
6.1 <i>SNPs</i> E INDEL NO GENE <i>BEST1</i> EM PACIENTES E FAMILIARES COM DMVB.....	34
6.2 SEGREGAÇÃO DOS <i>SNPs</i> E INDEL NAS FAMÍLIAS E SUA RELAÇÃO COM A DMVB	40
6.3 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA PROTEICA DO GENE <i>BEST1</i>	40
7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÃO	48
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
11 ANEXOS.....	62
12 ARTIGO.....	75

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Macular Viteliforme de Best (DMVB) (OMIM 153700) chamada de “Doença de Best” é um raro transtorno hereditário que causa a degeneração lenta e progressiva da retina (GASS, 1997). Estudos sobre a prevalência da DMVB são escassos e um último estudo do qual se tem notícia e realizado na Suécia, estimou-se que a prevalência seja 1 em 10.000 pessoas (BITNER et al., 2012). Possui padrão de herança autossômica dominante e em alguns casos apresenta expressividade variável e penetrância incompleta (BOON et al., 2009; GASS, 1997). Suas principais características são o padrão anormal do pico de luz do EOG (eletro-oculograma) e o acúmulo de pigmento fluorescente, chamado de lipofusina, nas células do epitélio pigmentado da retina (EPR) causam uma lesão conhecida como viteliforme (formato de gema de ovo) (DEUTMAN, 1969; ARDEN, 1962). Acredita-se que este acúmulo desencadeia um processo de dano oxidativo responsável pela lesão (BAKALL et al., 2007).

A origem da doença tem sido associada a alterações no gene *BEST1* (PETRUKHIN et al., 1998; MARQUARDT et al., 1998). Este gene codifica uma proteína transmembrana chamada de bestrofina-1 e responsável pelo transporte de Cl^- ativado por Ca^{2+} (SUN et al., 2002). Posteriormente outras funções e características foram atribuídas a bestrofina-1 tais como, reguladora do volume celular e inibidora de canais de Ca^{2+} voltagem dependente, entre outras (FISCHMEISTER, HARTZELL, 2005; YU et al., 2008).

Várias mutações foram encontradas neste gene, algumas delas responsáveis por outros transtornos como distrofia macular do adulto, bestrofinopatia autossômica recessiva, distrofia macular multifocal entre outras (ALLIKMETS et al., 1999; YARDLEY; BURGESS et al., 2008; BOON et al., 2007). A maioria das mutações se encontram em regiões chamadas de *hotspots* e afetam principalmente a porção terminal da proteína, região relativamente conservada e possivelmente crítica para a função da mesma (XIAO et al., 2008). Os mecanismos fisiopatológicos da doença ainda são desconhecidos.

O presente trabalho teve como objetivo principal investigar por sequenciamento direto do DNA o gene *BEST1* em busca de mutações em pacientes com DVMB e seus familiares. A caracterização das mutações nas famílias investigadas poderá contribuir para compor e/ou consolidar o painel de variações genéticas que têm sido associadas à DVMB. Como perspectiva futura, essa investigação visa auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação da doença, entender sua variabilidade de mutações e contribuir para o desenvolvimento de *kits* de diagnóstico molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA DA RETINA

A retina é uma estrutura de natureza neurosensorial formada por dez camadas histológicas (**Figura 1**), que revestem os dois terços internos da parede do globo ocular (câmara póstema do globo ocular). A retina tem como principal função receber os estímulos luminosos convertendo-os em estímulo elétrico para posterior transmissão pelas fibras do nervo óptico aos centros nervosos encarregados da percepção e do reconhecimento visual (VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SATO, 2002).

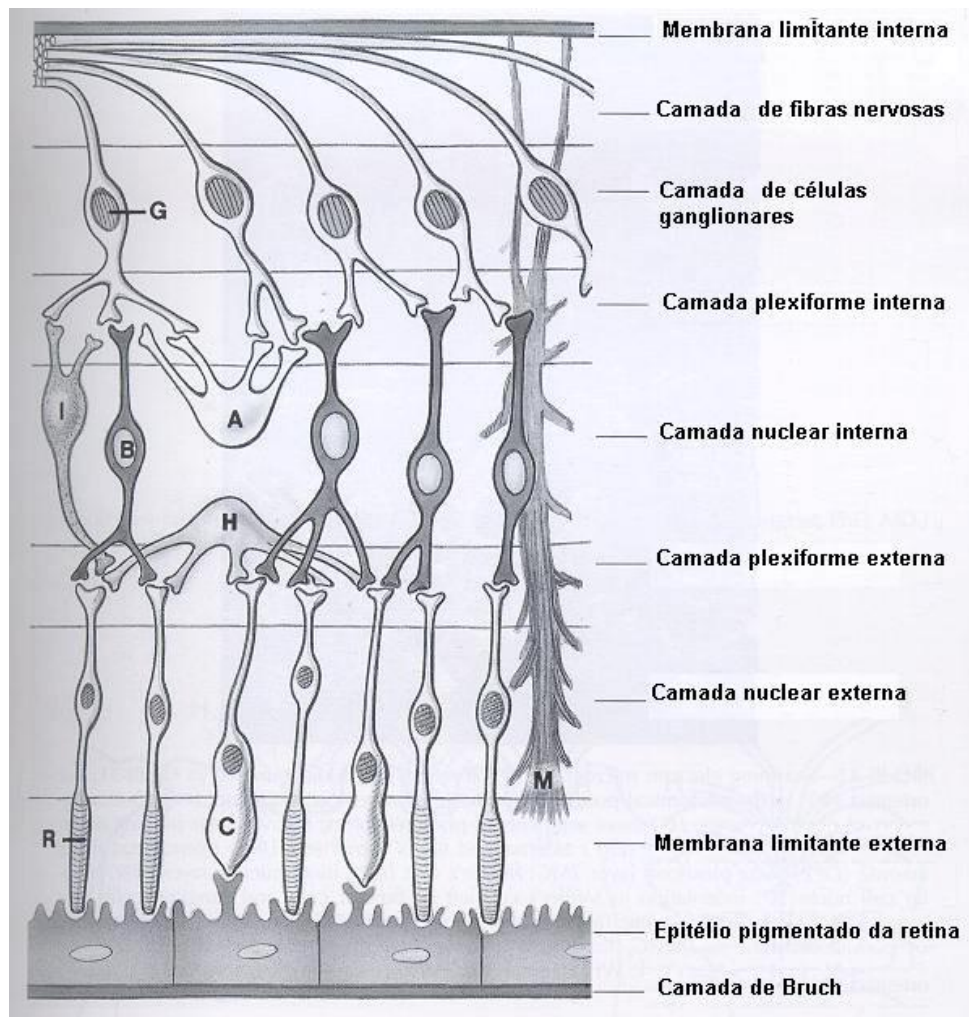


FIGURA 1 - ESTRUTURA DA RETINA. FONTE: BRUNETTE, 1969
C=cones, R=bastonetes, H=células horizontais, B=células bipolares, M=células de Müller, A= células amácrimas, G=células ganglionares e I=células plexiforme interna.

A retina estrutura-se em 4 regiões básicas:

- a) **Camada nuclear interna:** formada pelos núcleos dos neurônios bipolares. Contém também as células horizontais, que regulam a transmissão sináptica entre os fotorreceptores e os neurônios bipolares, e as células amácrimas, que modulam a transmissão sináptica entre os neurônios bipolares e as células ganglionares gerando o potencial oscilatório (VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SATO, 2002).
- b) **Membrana limitante externa:** situada entre os corpos celulares dos fotorreceptores (camada nuclear externa) e a porção fotorreceptora dessas células (cones e bastonetes). Tanto a membrana limitante externa quanto a interna são formadas pelas células de Müller (VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SATO, 2002).
- c) **Camada dos fotorreceptores:** os cones e bastonetes têm a função de converter o estímulo luminoso em estímulo elétrico através de uma reação fotoquímica – mediante a atuação do estímulo luminoso nos pigmentos visuais presentes nas membranas dos fotorreceptores. Os cones são responsáveis pela resolução visual, estão presentes em sua maioria, na área macular. Já os bastonetes são responsáveis pela visão noturna e em movimento. Eles estão presentes, em sua maioria, na periferia da retina (VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SATO, 2002).
- d) **Epitélio Pigmentar da Retina (EPR):** camada única de células cuboides contendo melanina. Interage com a camada de fotorreceptores (cones e bastonetes) e possui diversas funções, entre elas sintetizar a matriz entre os fotorreceptores (VAUGHAN; ASBURY; RIORDAN-EVA, 2003; SATO, 2002). Essa camada dá origem às ondas do EOG.

A região central da retina é denominada mácula e é caracterizada por uma concentração maior de cones. A mácula é dividida em três partes: fóvea, perifóvea e parafóvea. A fóvea é o local de maior acuidade visual (NAG; WADHWA, 2012).

2.2 DISTROFIA MACULAR VITELIFORME DE BEST

2.2.1 Histórico

A DMVB é uma distrofia macular autossômica dominante, com penetrância incompleta e expressividade variável com início na fase juvenil. A idade de início dos sintomas varia entre a primeira e segunda década de vida, normalmente na adolescência. Os achados clínicos característicos foram originalmente descritos pelo oftalmologista Friederich Best, em 1905, que analisou 18 portadores da distrofia macular viteliforme em uma única família. Esse pesquisador registrou um avanço progressivo de alterações maculares com o avançar da idade (BEST, 1905).

Mutações no gene *BEST1* são relacionadas com a doença. Os estudos da identificação do gene foram auxiliados por trabalhos da década de 70, os quais estudaram o padrão de herança em uma grande família sueca. A construção do heredograma dessa família (duas sub-famílias) se estendeu ao século XVII, permitindo a identificação de 246 casos de DMVB e também do ancestral comum (“efeito fundador”) responsável pela introdução da doença no país (NORDSTRÖM; BARKMAN, 1977).

Em 1992, Stone e colaboradores utilizaram abordagem de análise genética de ligação para mapear o gene da DMVB. Inicialmente nomeado de *VMD2*, localiza-se no braço longo do cromossomo 11 (11q13), próximo aos marcadores *D11S956*, *FCER1B* e *UGB* (uteroglobulina) (STONE et al., 1992; FORSMAN et al., 1992). O gene *ROM1* que codifica a proteína de membrana externa do bastonete a qual tem sido associada com a retinose pigmentar -outro tipo de distrofia de retina- também se encontra nesta região. Desta maneira, o gene *ROM1* foi considerado um forte candidato para a DMVB. Entretanto, em estudos mais detalhados constatou-se que o gene *ROM1* não segregava com a doença e que pacientes portadores da DMVB não apresentavam mutações em *ROM1* (GRAFF et al., 1994; NICHOLS et al., 1994; HOU et al., 1996 citado por HARTZELL et al., 2008).

Sendo assim, o intervalo entre os marcadores investigados foi redimensionado para 980 kb para incluir a região do gene *BEST1* flanqueada pelos marcadores *D11S4076* e *UGB* (GRAFF et al., 1997). Petrukhin et al. (1998) e

Marquardt et al. (1998) utilizando técnicas de clonagem, dados de mapeamento genético, identificação das mutações nos pacientes e estudos de expressão forneceram evidências de que se tratava mesmo do gene responsável pela DMVB. Inicialmente foi chamado de *VMD2* (distrofia macular viteliforme tipo 2) (PETRUKHIN et al., 1998 e MARQUARDT et al., 1998). Posteriormente, o gene teve seu nome alterado por recomendações de comitês de nomenclatura (*HUGO- Human Genome Organization* e *Mouse Genome Database*) para *BEST1* (HARTZELL et al., 2008).

2.2.2 Características clínicas

A principal característica clínica observada em pacientes é o acúmulo de lipofuscina (pigmento sinalizador do envelhecimento celular no Epitélio Pigmentar da Retina (EPR) e também abaixo dela. Essa deposição é responsável pela morte das células do EPR e também dos fotorreceptores originando a atrofia macular (FRANGIEH; GREEN; FINE, 1982; WEINGEIST; KOBRIN; WATZKE, 1982; O'GORMAN et al., 1988 citado por ALLIKMETS et al., 1999). Além dessas características, pacientes portadores da DMVB apresentam baixa razão entre o pico claro/escuro no eletro-oculograma (EOG) considerando anormalidades no EPR (ARDEN, 1962).

Algumas classificações foram propostas, como as de Deutman (1969); Mohler e Fine (1981) e Gass (1997). A classificação mais utilizada quanto ao aspecto clínico é a de Gass (citado por FERRARA, 2010) que compreende os seguintes estágios de evolução clínica:

Estágio pré-viteliforme: não apresenta alterações de fundo de olho. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar lesão viteliforme (em forma de gema de ovo) nas primeiras semanas de vida. Normalmente, essas alterações só serão visualizadas após os primeiros anos de vida (DEUTMAN, 1969 citado por FERRARA, 2010).

Viteliforme: são lesões subretinianas circulares, bem delimitadas e preenchidas de material amarelado chamado de lipofuscina com aparência de “gema de ovo”, estas

podem ocorrer na infância ou no início da adolescência (**Figura 2A**) (FERRARA, 2010).

Pseudohipópio: no nível horizontal, o material amarelado se encontra na parte inferior da lesão. Podendo haver um deslocamento, caso o paciente incline a cabeça. Parecendo que o material amarelado está gravitando no espaço sub-retiniano (**Figura 2B**) (FERRARA, 2010).

Vitelirruptivo: fase em que há rompimento da lesão e sua aparência não é mais homogênea, estágio chamado de “*scrambled egg*” (ovo mexido em inglês). Os depósitos podem se localizar eventualmente na periferia ao redor da lesão (**Figura 2C**) (FERRARA, 2010).

Atrófico: a mancha amarelada pode desaparecer e restar no local apenas uma região arredondada com aspectos de atrofia da EPR (**Figura 2D**) (FERRARA, 2010).

Cicatricial ou estágio neovascular: nesta fase pode haver a ocorrência de uma cicatriz. A diminuição na acuidade visual pode ocorrer nesta fase. Após o aparecimento da cicatriz, pode ocorrer nessa fase a neovascularização (FERRARA, 2010).

Entretanto, devido à expressividade variável que é observada nos pacientes portadores de DMVB, esses estágios podem não ser observados em todos os pacientes ou não seguir esta sequência típica de eventos. Havendo também a possibilidade de estágios diferentes em cada olho ou até mesmo pacientes que apresentam no mesmo momento características de mais de um estágio (BOON, 2009; FERRARA, 2010).

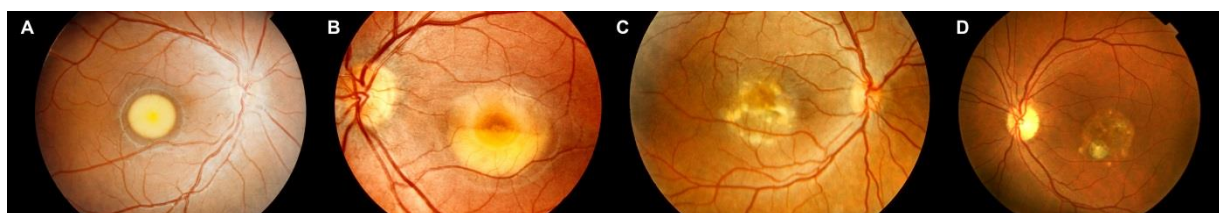


FIGURA 2 - EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DMVB.
A) Viteliforme; B) Pseudohipópio; C) Vitelirruptivo; D) Atrófico.
Fonte: NAOYE SHIOKAWA

2.2.3 Eletro-oculograma (EOG)

Este exame fundamenta-se na avaliação do potencial elétrico da retina, em especial das camadas mais internas que são eletropositivas e, das camadas mais externas que são eletronegativas (**Figura 3**). A diferença de potencial elétrico entre essas camadas é o que gera os picos claros e escuros relacionados à atividade dos fotorreceptores. Os valores obtidos por meio deste exame revelam o potencial da adaptação do olho quando submetido ao escuro e posterior exposição à luz, chamada de fase clara-fotópica ou *light peak* (LP). Neste exame mede-se a adaptação do olho a situação inversa: olho submetido à luz e depois exposto ao escuro- chamada de fase escura-escotópica ou *dark trough* (DT). A relação entre o valor máximo alcançado na fase clara e o valor mínimo alcançado na fase escura fornece o chamado Índice Arden (IA). Considera-se uma anormalidade quando o IA <1,5 (ZAGO, 2010).

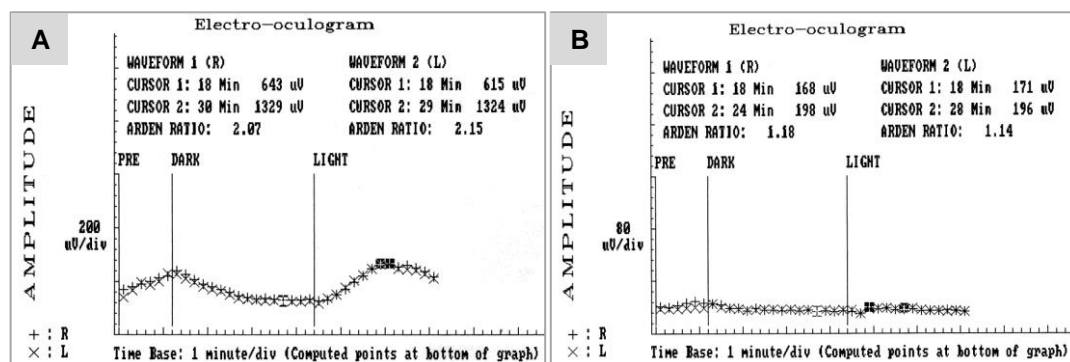


FIGURA 3 - EXEMPLO DE ELETRO-OCULOGRAMA.
A: Resultado normal; B: Resultado alterado. Fonte: Mário Sato

2.2.4 Acúmulo de lipofusцина

Lipofusцина é um pigmento fluorescente que resulta de uma mistura de proteínas e lipídeos parcialmente oxidados (SCHUTT et al., 2002). Ela tem sido considerada marcador de envelhecimento celular (SHAMSI; BOULTON, 2001). O acúmulo deste pigmento tem sido relacionado como a maior causa da degeneração dos fotorreceptores em doenças como DMRI (distrofia macular relacionada à idade).

O maior componente fluorescente da lipofuscina é o N-retinildenol N-retiniletanolamina, chamado de A2E (FINNEMANN; LEUNG; RODRIGUEZ-BOULAN, 2002; SHAMSI; BOULTON, 2001 citados por HARTZELL et al., 2005). O acúmulo deste subproduto (**Figura 4**) pode estar associado com problemas na fagocitose e/ou nas funções lisossomais (ELDRED, 1995).

O exame histopatológico de dois indivíduos portadores da DMVB (BAKALL et al., 2007) detectou que o A2E está na composição do pigmento acumulado, assim como em pacientes com a doença de Stargardt e DMRI.

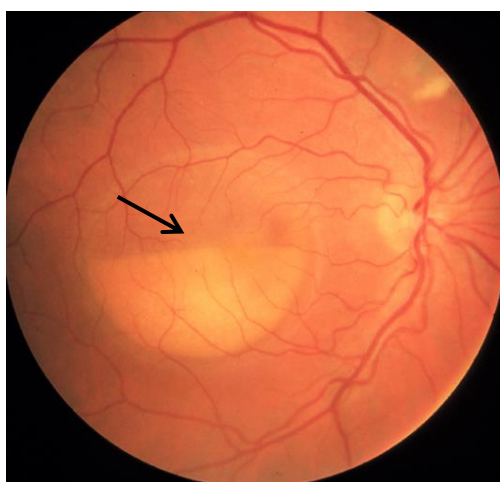


FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DE FUNDO DE OLHO DIREITO.
Um acúmulo de lipofuscina pode ser observado na parte central da imagem. Fonte: THS.

2.3 GENE *BEST1*

O gene *BEST1* (OMIM 607854) codifica uma proteína que faz parte da família das bestrofinas, canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} (CaCCs). Em humanos existem outros genes parálogos, *BEST2*, *BEST3* e *BEST4* que codificam proteínas que também compõem a família das bestrofinas (STOHR et al., 2000; TSUNENARI et al., 2003).

O gene possui 21.580 pares de base (pb) e está localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q12.3). Contém 11 éxons dos quais 10 codificam a proteína bestrofina-1 (**Figura 5**). O éxon 1 não contém o sítio de início de tradução, portanto sua sequência não se encontra na proteína final, este sítio se encontra no éxon 2 na posição +1455 pb (ESUMI et al., 2004).

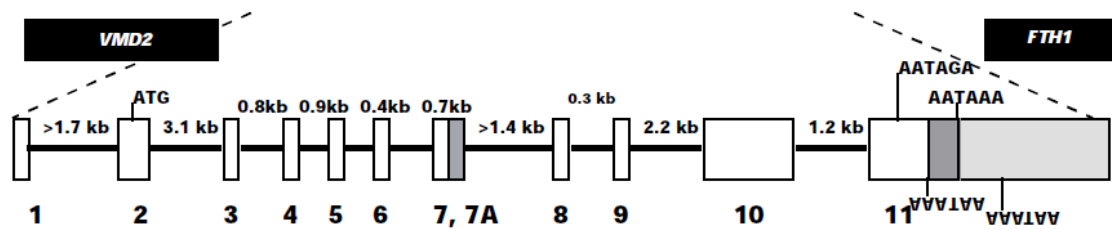


FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO DO GENE *BEST1*. Fonte: PETRUKHIN et al., 1998.

Os principais transcritos alternativos *BEST1* estão descritos nas bases de dados Genbank e Ensembl. Várias isoformas proteicas tem sido associadas ao gene *BEST1* sendo que as mais investigadas são as isoformas Best1V1 e Best1V2 (KUO et al., 2014). Diferenciam-se na extremidade amino terminal (N) e carboxi terminal (C) devido a diferenças no *splicing* alternativo (KUO et al., 2014).

A isoforma Best1V1 (número de acesso do Genbank: NM_004183), resulta de um transcrito que inclui todos os 11 éxons e produz a proteína normal com 585 aminoácidos. A isoforma Best1V2 (número de acesso no Genbank: NM_001139443), resulta de um transcrito que não contém o éxon 2, produz uma proteína com 604 aminoácidos decorrente de *splicing* alternativo no éxon 10, resultando em uma proteína com um COOH terminal mais longo. O éxon 2 codifica um domínio transmembrana e sua ausência resulta numa proteína sem o canal de Cl^- (HARTZELL et al., 2008). No entanto, uma nova isoforma resultante de um transcrito onde o éxon 2 estava ausente foi descrita e, ela apresentava um canal de Cl^- funcional. Esta isoforma foi isolada de uma cultura de células HEK-293 e denominada de Best1V1 Δ ex2 (**Figura 6**).

Em um estudo anterior Xiao e colaboradores relataram que a extremidade COOH seria crítica para função da proteína e para a formação do canal (XIAO et al., 2008). A isoforma Best1V1 Δ ex2 apresenta a estrutura terminal como a forma canônica, considerado um quesito necessário para o transporte da proteína até a membrana da célula (KUO et al., 2014).

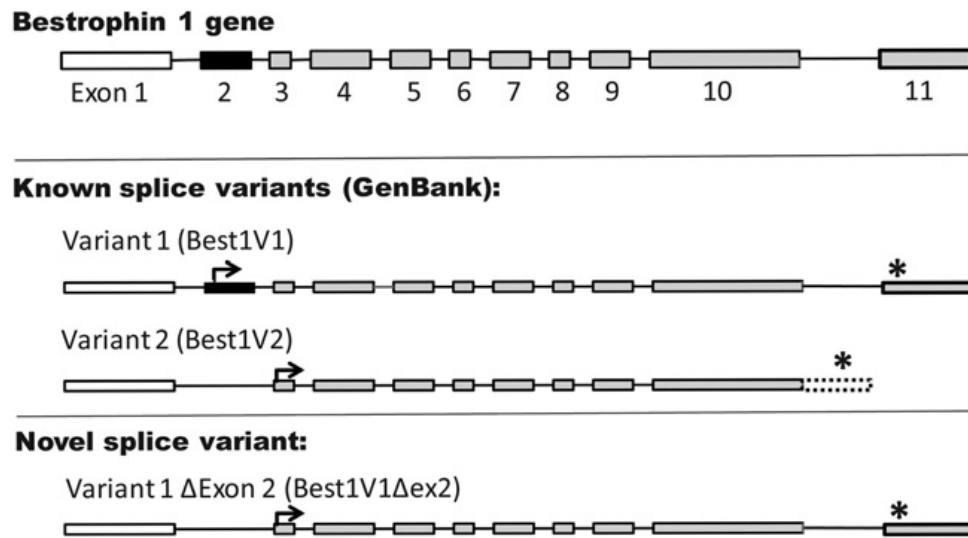


FIGURA 6 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO GENE *BEST1* E SEUS TRÊS PRINCIPAIS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS. Fonte: KUO et al., 2014

2.3.1 Mutações no gene *BEST1*

Desde a descoberta do gene responsável pela DMVB muitas mutações foram descritas e, mais de 200 delas estão depositadas em bases de dados como na LOVD (*Leiden Open Variation Database*) Universidade de Regensburg e da Retina Internacional.

Mutações no gene *BEST1* têm sido associadas com outras cinco doenças em humanos além da distrofia macular viteliforme Best (DMVB) (PETRUKHIN, 1998; MARQUARDT, 1998); são elas: distrofia macular viteliforme do adulto (DMVA - OMIM 608161) (ALLIKMETS et al., 1999); Distrofia Macular Relacionada a Idade (DMRI) (OMIM 603075) (ALLIKMETS et al., 1999), Distrofia Viteliforme Multifocal (DVM) (BOON et al., 2007); Vitreoretinocoroideopatia Autossômica Dominante (VIRCAD – OMIM 193220) (YARDLEY et al., 2004); Bestrofinopatia Autossômica Recessiva (BAR – OMIM 611809) (BURGESS et al., 2008) e Retinose Pigmentar (RP50 – OMIM 613194) (DAVIDSON et al., 2009) (**Tabela 1**).

TABELA 1 – OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS MUTAÇÕES NO GENE *BEST1*

Doença	OMIM	Características Clínicas	Genes associados	Principais alterações nucleotídicas bestrofina-1	Referências
Distrofia Macular do Adulto (DMVA)	608161	Lesões viteliformes de desenvolvimento tardio, geralmente entre a quinta e sexta década de vida.	<i>PRPH2</i> <i>BEST1</i> <i>IMPG1</i> <i>IMPG2</i>	Thr6Pro; Arg47His; D312N	KRAMER et al., 2000
Degeneração Macular relacionado a idade (DMRI)	603075	Transtorno caracterizado por presença de drusas, depósito de material extracelular nas camadas internas, membrana de Bruch e abaixo do EPR. Início dos sintomas pode ocorrer a partir dos 50 anos de idade. Vários fatores ambientais importantes têm sido associados com a doença como tabagismo, dieta, hipertensão e exposição ao sol.	<i>APOE</i> <i>ABCR</i> <i>BEST1</i> <i>CFH</i> <i>HTRA1</i> entre outros	Thr216Ile; Arg105Cys; Lys149stop; Glu119Gln; Val275Ile	ALLIKMETS et al., 1999; LOTERY et al., 2000
Distrofia Viteliforme Multifocal (DVM)	153700	DVM e DMVB são consideradas variações da mesma entidade. Ambas possuem lesões viteliformes bem delimitadas na mácula, na DMV além destas há outros depósitos ao redor das arcadas vasculares da retina e em torno do disco óptico.	<i>BEST1</i>	Ala195Val; Leu134Val; Asn296Lys	BOON et al., 2007
Vitreoretinocoro ideopatia Autossômica Dominante (ADVIRC)	193220	É caracterizada por uma banda circunferencial de hiperpigmentação na periferia da retina. Associada a outros achados oculares como microftalmia, microcórnea, glaucoma de ângulo fechado, catarata entre outros. Apresenta anormalidades no EOG	<i>BEST1</i>	Val86Met Val239Met Tyr236Cys Val235Leu Val235Ala	YARDLEY et al., 2004
Bestrofinopatia Autossômica Recessiva (BAR)	611809	Causada por homozigose ou heterozigose composta de mutações no gene <i>BEST1</i> , compatível com herança recessiva. Comumente pacientes não tem alterações no EOG, mas sim no eletrorretinograma (ERG) Podem apresentar algumas alterações oculares como glaucoma de ângulo fechado. Pacientes não apresentam lesões viteliformes.	<i>BEST1</i>	Arg141His Leu134Val Arg200Stop Met325Thr Asp312Asn Ala195Val Arg13His Tyr33His Arg255Trp	BURGESS et al., 2008 TIAN et al., 2014

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Doença	OMIM	Características Clínicas	Genes associados	Principais alterações nucleotídicas bestrofina-1	Referências
Retinose Pigmentar (RP)	613194	Grupo de doenças com mesmo fenótipo, entretanto geneticamente heterogêneo mais de 100 genes encontrados nos mais diversos casos. Distrofia progressiva dos cones e bastonetes, caracterizada por nictalopia, perda de visão periférica e anormalidade no ERG.	BEST1 <i>RHO</i> <i>PRPH2</i> <i>RP1</i> <i>CRB1</i> <i>ROM1</i> <i>ABCA4</i>	L140V I205T D228N Y227C	DAVIDSON et al., 2009

A DMVB tem sido descrita predominantemente em europeus e descendentes. As mais relatadas são as mutações T6P, A243V e I295del relativamente frequentes na população alemã e holandesa e W93C na população sueca, possivelmente devido ao efeito fundador (WHITE; MARQUARDT; WEBER, 2000; BOON et al., 2009). A maioria das mutações (90%) descritas são de sentido trocado (missense). Um número menor de mutações tais como, mudança de matriz de leitura (*frameshift*), inserções ou deleções que não alteram a matriz de leitura (*inframe*) e mutações que causam códon prematuro de parada (*nonsense*) têm sido associadas à DVMB (BOON et al., 2009). Entre as mutações *frameshift* podemos citar como exemplo, a 1574delCA (CALDWELL et al., 1999) e *inframe*, a mutação Ile295del, (KRAMER et al., 2000; MARQUARDT et al., 1998; WABBELS et al., 2006; LOW et al., 2011; SODI et al., 2012).

Schatz et al., (2006) relataram a ocorrência de uma mutação que causa códon prematuro de parada (Tyr29stop) combinada com uma mutação de sentido trocado (Arg141His), configurando um caso de heterozigoto composto compatível com a forma recessiva (SCHATZ et al., 2006). Outra mutação similar relatada foi a R200X (BURGESS et al., 2008; TIAN et al., 2014) presente em pacientes com casos de BAR (bestrofina autossômica recessiva descrita por Burgess et al., 2008). Estudos funcionais realizado em células HEK-293 revelaram função reduzida da proteína, levando a conclusão de se tratar de um fenótipo nulo onde não ocorre a síntese da bestrofina-1 (BURGESS et al., 2008).

A mutação Arg141His tem se apresentado interessante por estar associada com diferentes fenótipos e diferentes padrões de herança, como aquele observado nos pacientes heterozigotos compostos e no padrão recessivo clássico (homozigoto para Arg141His). Outro autor também relatou a mutação Arg141His associada com a mutação L41P, mas em indivíduos sem sinais de lesões viteliformes. Dessa forma, baseando-se no fenótipo e genótipo descreveu uma nova alteração, referida como bestrofinopatia com padrão autossômico recessivo (BAR- classificado por BURGESS et al., 2008). Um estudo de expressão gênica revelou que a mutação Arg141His em homozigose ou associada com a mutação Pro152Ala resultou em pouca ou nenhuma atividade da proteína, caracterizando um fenótipo nulo. Concluíram que canais de Cl⁻ que se estruturavam com proteínas homoméricas Arg141His associadas ao genótipo homozigoto ou proteínas heteroméricas (Arg141His/Pro152Ala) esta última associada ao genótipo heterozigoto composta impediam ou anulavam a atividade do canal (BURGESS et al., 2008). Para a proteína resultante da associação da mutação Arg141His na presença de Arg141Arg (selvagem) previa-se uma proteína com canal de Cl⁻ funcional.

Johnson e colaboradores investigaram a expressão das proteínas com as mutações W93C, V9M e R218C em cultura de células MDCKII (do inglês *Madin Darby canine kidney II cells*). Neste caso observou-se que a função do canal de Cl⁻ estava diminuída em todas as células; entretanto a localização da proteína na célula as diferenciava. Nas linhagens celulares R218C as proteínas localizavam-se na região basolateral da célula, enquanto nas linhagens W93C e V9M localizavam-se nos compartimentos intracelulares. Em outra cultura de células fhRPE (células do epitélio pigmentar da retina de feto humano) a proteína mutante W93C se localizou na membrana basolateral e a mutante V9M continuou nos compartimentos intracelulares. Além disso, a proteína mutante V9M impediu a correta localização da proteína normal (selvagem) revelando um efeito dominante negativo. A falta de atividade do canal possivelmente se deve a ausência da proteína na membrana plasmática (JOHNSON et al., 2013). As principais mutações já descritas na literatura estão listadas na **Tabela 2**.

TABELA 2 - PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NA PROTEÍNA BESTROFINA-1 CODIFICADA PELO GENE *BEST1*

ALTERAÇÃO AMINOÁCIDO/ NUCLEOTÍDEO	ÉXON	TIPO DE MUTAÇÃO	DIAGNÓSTICO	REFERÊNCIA
T6P Thr6Pro	2	Sentido trocado	DMVB e DMVA DVM	PETRUKHIN et al., 1998; BAKALL et al., 1999; KRAMER et al., 2000; WHITE; MARQUARDT; WEBER et al., 2000; BOON et al., 2009; BOOIJ et al., 2010
V9M Val9Met	2	Sentido trocado	DMVB	MARQUARDT et al., 1998; KRAMER et al., 2000; QUERQUES et al., 2009
A10T Ala10Thr	2	Sentido trocado	DMVB	MARQUARDT et al., 1998; KRAMER et al., 2000
L41P Leu41Pro	2	Sentido trocado	DMVAR BAR	ZHAO et al., 2012; BURGESS et al., 2008
W93C Trp93Cys	4	Sentido trocado	DMVB	PETRUKHIN, et al., 1998; CALDWELL, et al., 1999; FRENNESEN et al., 2013
L134V Leu134Val	4	Sentido trocado	DMVB DVM	BOON et al., 2009, TIAN et al., 2014 (chineses); MARCHANT et al., 2007; BOOIJ et al., 2010
R141H Arg141His	4	Sentido trocado	DMVB DMVAR	KRAMER et al., 2000; LOTERY et al., 2000; TIAN et al., 2014; SCHATZ et al., 2006; BURGESS et al., 2008; BOON et al., 2013; KINNICK et al., 2011; MAC DONALD et al., 2012
N179del Asn179del	5	Inframe	BAR	CASCAVILLA et al., 2012
A195V Ala195Val	5	Sentido trocado	DVM	LOTERY et al., 2000; BOON et al., 2009; TIAN et al., 2014; BOOIJ et al., 2010
R218C Arg218Cys	6	Sentido trocado	DMVA DMVB	MARQUARDT et al., 1998; CALDWELL et al., 1999; BAKALL et al., 1999; LOTERY et al., 2000; LOW et al., 2011; TIAN et al., 2014; SODI et al., 2012; MARCHANT et al., 2001; ATCHANEYASAKUL et al., 2008 (tailandeses).

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

ALTERAÇÃO AMINOÁCIDO/ NUCLEOTÍDEO	ÉXON	TIPO DE MUTAÇÃO	DIAGNÓSTICO	REFERÊNCIA
R218H Arg218His	6	Sentido trocado	DMVA	LOTARY et al., 2000; KAY et al., 2012; MARCHANT et al., 2007; MARCHANT et al., 2001; BOOIJ et al., 2010
Y227N Tyr227Asn	6	Sentido trocado	DMVB DMVA	MARQUARTD et al; 1999; PETRUKHIN et al., 1998; BAKALL et al., 1999, LOTARY et al., 2000; KAY et al., 2012. BOOIJ et al., 2010
A243V Ala243Val	7	Sentido trocado	DMVB DMVA	KRAMER et al., 2000; LOW 2011 et al., 2011; SODI et al., 2012; QUERQUES et al., 2009.
I295del Ile295del	8	<i>Inframe</i>	DMVB	KRAMER et al., 2000; MARQUARDT et al., 1998; LOW et al., 2011; YANAGI et al., 2002 (Japoneses)
P297S Pro297Ser	8	Sentido trocado	DMVB	ALLIKMETS et al., 1999
E300D Glu300Asp	8	Sentido trocado	DMVB	CALDWELL et al., 1999; LOTARY et al., 2000
E300K Glu300Lys	8	Sentido trocado	DMVB	KRAMER et al., 2000; LOTARY et al., 2000
D301E Asp301Glu	8	Sentido trocado	DMVB	CALDWELL et al., 1999; KRAMER et al., 2000
F305S Phe305Ser	8	Sentido trocado	DMVB	MARQUARDT et al., 1998; WHITE et al., 2000; LOW et al., 2011.
D312N Asp312Asn	8	Sentido trocado	DMVB BAR	SEDDON et al., 2001; SODI et al., 2011; BOON et al., 2013; BURGESS et al., 2008
1574delCA	10	Mudança de quadro de leitura	DMVB	CALDWELL et al., 1999.

Legenda: DMVB - distrofia macular viteliforme Best (juvenil); BAR - bestrofinopatia autossômica recessiva; DVM - Distrofia viteliforme multifocal; DMVA - distrofia macular viteliforme do adulto; DMVAR – distrofia macular viteliforme autossômica recessiva.

Grande parte das mutações relacionadas à DMVB estão localizadas nos éxons 2, 4, 6 e 8 em regiões conhecidas previamente como *hotspots* (WHITE; MARQUARDT; WEBER, 2000). Na **Figura 7** podem ser observados os aminoácidos alterados ao longo da sequência de resíduos de aminoácidos da bestrofina-1.

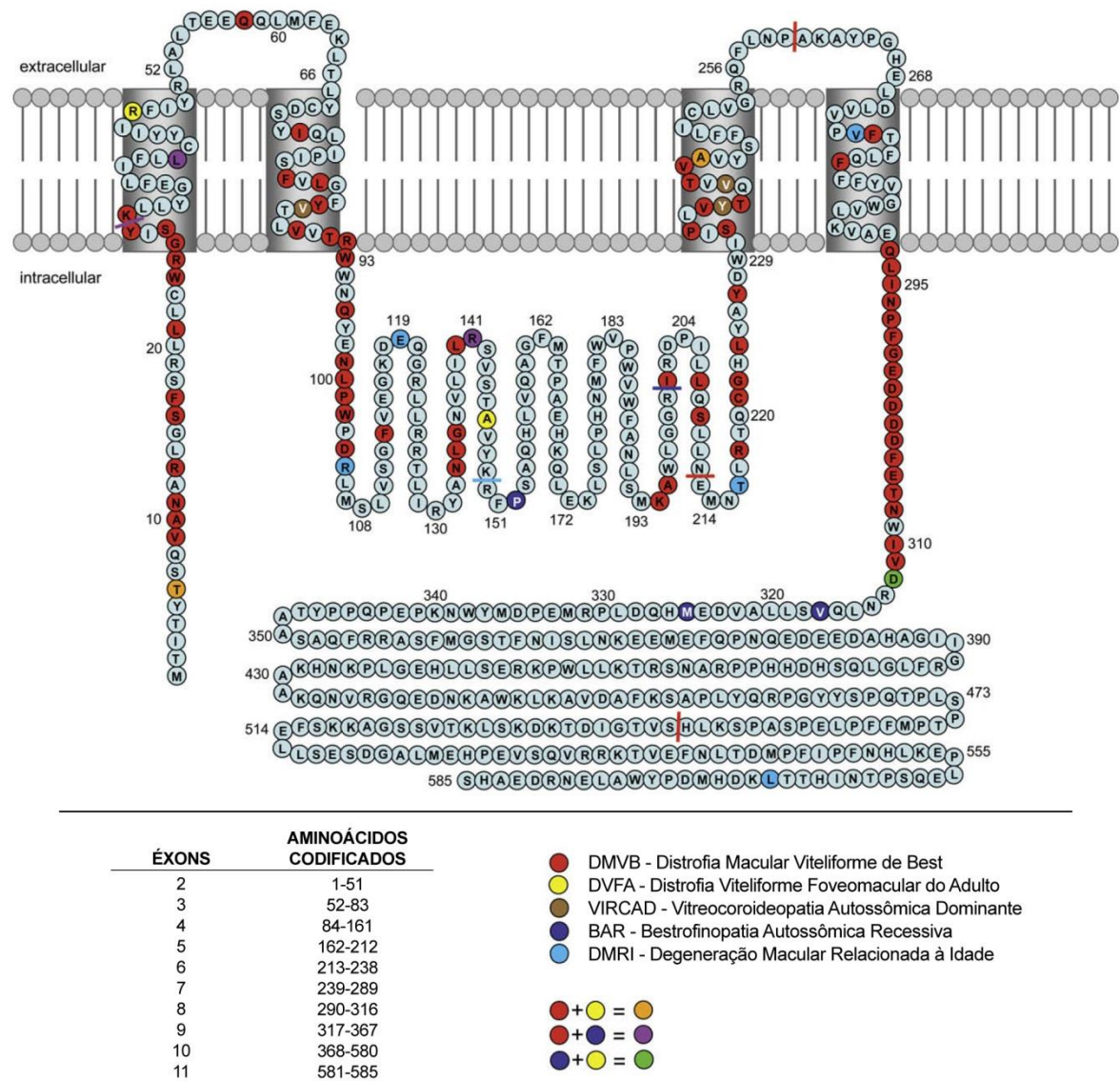


FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS ALTERADOS AO LONGO DA PROTEÍNA BESTROFINA-1. Modelo de MILENKOVIC et al., 2007. Fonte: Adaptado de BOON et al., 2009.

A expressividade variável e penetrância incompleta são frequentemente observadas na DMVB. Algumas mutações relacionadas com a DMVB foram encontradas em indivíduos assintomáticos, por exemplo, mutação I295del, N99K, (WABELLS et al., 2006), P297S e E300D (SEDDON et al., 2003) (SEDDON et al.,

2003) ilustrando a condição de penetrância incompleta em algumas mutações. O impacto da mutação depende da presença ou ausência do efeito dominante negativo da proteína mutante na proteína tipo selvagem. O efeito patológico pode estar associado à taxa de subunidades mutantes comparadas com às do tipo selvagem e, até mesmo em proteínas mutantes que não têm efeito dominante negativo sobre as proteínas tipo selvagem (YU et al., 2007).

A expressividade variável pode ser percebida através de evidências observadas em pacientes com a mesma mutação e que podem apresentar características clínicas diferentes, mesmo em se tratando de indivíduos da mesma família. A variabilidade fenotípica pode ser atribuída à presença de genes modificadores e fatores ambientais. Fatores transcricionais que interagem com sítios reguladores na região promotora do gene *BEST1* podem também aumentar a produção da proteína tipo selvagem e a mutante (YU et al., 2007).

2.3.2 Regulação da expressão do gene *BEST1*

Em estudos com camundongos transgênicos e em culturas de células D407 (células do EPR) foi identificado que o fragmento -154pb a +38 pb (pares de base) na região promotora orienta e, é suficiente para direcionar a expressão específica de *BEST1* no EPR. Também constatou-se que a região compreendida entre -56pb a -42pb contém a sequência CACGTG (E-box 1; localizada entre -47pb a -42pb), considerado um elemento regulador positivo da transcrição. Próximo a esta região, localiza-se a sequência CAAGTG (E-box 2; -69pb a -64pb) com função e relevância ainda não comprovadas (ESUMI et al., 2004; ESUMI et al., 2007).

Observou-se que mutações no E-box 1 diminuíram a expressão da luciferase nas células D407; entretanto isto não foi observado no E-box 2 (ESUMI et al., 2004). Para complementar os estudos funcionais no mesmo experimento os autores testaram um fator de transcrição já caracterizado anteriormente no EPR, denominado MITF (fator de transcrição associado à microftalmia). Esse fator é um membro básico da família de fatores transcripcionais que se ligam ao E-box e, caracterizados por apresentarem motivos funcionais do tipo “zíper de leucina e hélice-volta-hélice”. MITF aumentou a expressão do gene repórter nas células D407 de forma dependente de E-box. Foi sugerido que MITF realiza a transativação de *BEST1* agindo no E-box 1 por ligação direta ao DNA e, no E-box 2 por mecanismos ainda não conhecidos (ESUMI et al., 2004; ESUMI et al., 2007).

Outros fatores de transcrição associadas a microftalmia (MITF), MITF-TFE, TFE3 e TFEB, também estão envolvidos na modulação do promotor de *BEST1*. Utilizando-se de abordagem com RNAsi (pequeno RNA de interferência) constatou-se que o TFE3 e TFEB podem transativar o promotor de *BEST1* (ESUMI et al., 2007).

Outros fatores e elementos transcripcionais têm sido referidos como responsáveis pelo aumento da expressão de *BEST1*. Por exemplo, OTX2 (*orthodenticle homeobox2*) desempenha papel importante na formação da cabeça, desenvolvimento do cérebro e alguns aspectos da formação do olho. Juntamente com *CRX* (*cone-rod homeobox*) relacionado ao desenvolvimento dos fotorreceptores

na retina, pode modular positivamente o promotor de *BEST1* no EPR (ESUMI et al., 2009).

O fator de transcrição SOX9 - SRY (*sex-determining region Y*) box 9 foi reconhecido como regulador da expressão de *BEST1* no EPR. SOX 9, interage com MITF e OTX2 e comanda ativação sinérgica do promotor de *BEST1* mediante a organização no SOX site no promotor de *BEST1*, definindo o SOX9 como principal agente da expressão de *BEST1* (MASUDA; ESUMI, 2010).

É possível que OTX2, MITF, CRX e SOX9 atuem como genes modificadores responsáveis pela variedade de expressão e penetrância incompleta observada nos distúrbios associados ao gene *BEST1*; entretanto não são conhecidos os mecanismos relacionados (BOON et al., 2009).

2.4 PROTEÍNA BESTROFINA-1

A proteína codificada pelo gene *BEST1* tem 585 aminoácidos, com massa de 68 kDa e integra de um grande grupo de proteínas denominadas de canais de Cl⁻ ativados por Ca²⁺ (CaCCs). Ela foi relatada pela primeira vez por Sun et al. (2002) que identificou-a como fazendo parte das proteínas de Cl⁻ ativados por Ca²⁺, tal evidência foi observada em células de rim de embrião humano (HEK).

A proteína é expressa predominantemente no epitélio pigmentar da retina, localizando-se principalmente na membrana basolateral das células epiteliais (MARMORSTEIN et al., 2000). Sua expressão também foi observada em células do sistema nervoso central, medula espinhal, testículo (PETRUKIN et al., 1998), traquéia (BARRO SORIA et al., 2009; DUTA et al., 2006) e rim (BARRO SORIA et al., 2009).

Várias funções e mecanismos pelos quais a bestrofina-1 age têm sido postulados. Sua ativação pode se dar via ligação direta do Ca²⁺ e, por ligação dependente de fosforilação por proteína quinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina (CMKII); o transporte de Cl⁻ deve acontecer mediante a disponibilidade de ATP (CHIEN; ZHANG; HARTZELL, 2006 citado por MILENKOVIC et al., 2009). A região

C terminal da bestrofina-1 interage com a proteína fosfatase A, que desempenha um papel na sinalização celular (MARMORSTEIN et al., 2002).

Experimentos *in vitro* sugerem que a atividade do canal de Cl^- da bestrofina: a) é regulada pelo volume celular (FISCHMEISTER, HARTZELL, 2005; CHIEN; HARTZELL, 2007; CHIEN; HARTZELL, 2008; HARTZELL et al., 2008); b) modula a reserva e a liberação de Ca^{2+} intracelular (BARRO SORIA et al., 2010; NEUSSERT et al., 2010), o que foi confirmada por estudos em iPSC (SINGH et al., 2012); c) inibe canais de Ca^{2+} voltagem dependente (Ca_v) (YU et al., 2008).

Pensava-se que anormalidades no transporte desses íons fossem as responsáveis pela reduzida razão de pico de luz (*light peak*- LP) encontrada no EOG dos pacientes portadores da DMVB (SUN, 2002; HARTZELL, 2008). Entretanto, essa evidência não foi comprovada nos modelos animais, como em camundongo *knockout*, que não apresentava esse LP reduzido nem sinais clínicos de degeneração na retina, mas apenas uma alteração na resposta a intensidade luminosa. (MARMORSTEIN et al., 2006). Contudo, há diferenças entre as retinas de camundongo e humanos, especialmente no que se refere às células fotorreceptoras e camundongos não apresentam macula como os humanos. Outra importante conclusão foi que o LP poderia ser gerado não apenas pelo *BEST1*. Resultados conflitantes como estes desafiavam a hipótese de que a bestrofina-1 seria apenas um canal de Cl^- clássico (HARTZELL et al., 2008).

Além do modelo murino para DMVB, outro exemplo de modelo animal é o canino. Estudos realizados por Guziewicz e colaboradores em cães portadores da Retinopatia Canina Multifocal (RCM), revelaram mutações em *BEST1* (GUZIEWICZ et al., 2007; GUZIEWICZ et al., 2011). Um transtorno similar e relativamente raro também ocorre em humanos, Distrofia Viteliforme Multifocal (DVM), em trabalho realizado por Boon et al. (2007) também relataram mutações em *BEST1*. Embora ambos os transtornos tenham semelhanças fenotípicas, RCM é herdado de forma recessiva e suas características são mais parecidas com BAR. Além do intuito de esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos este modelo também tem sido empregado para testar tratamentos terapêuticos, como por exemplo, a terapia gênica.

Fortes indícios mostram que a bestrofina-1 pode não ser apenas uma CaCC, mas também estar envolvida como reguladora de transporte de íons. Argumentos que apoiam a primeira opção fundamentam-se em observações segundo as quais mutações resultam na troca de certos aminoácidos alteram a permeabilidade e a condutância do canal (revisado por HARTZELL et al., 2008). E a segunda opção é justificada pelas particularidades entre as bestrofinas e CFTR (do inglês, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), pois este também está relacionado ao transporte de íons de Cl^- que por sua vez também regula outras proteínas de transporte de membrana. Camundongos *knockout* CFTR também não exibem o fenótipo esperado, neste caso, problemas pulmonares. Assim como *BEST1*, há relatos de mais de 100 mutações descritas encontradas nos pacientes com Fibrose Cística. Portanto é possível que bestrofina-1 atue da mesma forma, regulando a atividade de outras proteínas (revisado por HARTZELL et al., 2008).

Estudos cristalográficos da proteína de uma espécie de frango (*Gallus gallus*), que apresenta 74% de similaridade com *BEST1* humano revelaram que a mesma apresenta a estrutura do canal de Cl^- ativado por Ca^+ . Este e entre outros estudos similares confirmam a permeabilidade ao Cl^- e também a outros íons e, a impermeabilidade ao SO_4^{2-} (DICKSON; PEDI; LONG, 2014). Bestrofina-1 também é permeável ao ânion bicarbonato (HCO_3^-) e, possivelmente funciona com um canal de HCO_3^- considerando-se que este ânion participa de processos fisiológicos da retina (QU et al., 2008).

Novas evidências adicionaram à lista outros elementos aos quais a bestrofina-1 seria permeável, o que auxiliaria, de alguma forma, na elucidação do mecanismo fisiopatológico da DMVB. Estudos permitiram hipotetizar um mecanismo de liberação de GABA (ácido γ -aminobutírico) (LEE et al., 2010) e glutamato (WOO et al., 2012) através do canal de Cl^- da bestrofina-1 nas células da glia cerebelar e astrócitos. É possível que a bestrofina atue sinergisticamente com GABA e glutamato inibindo as sinapses no sistema nervoso central (LEE et al., 2010; WOO et al., 2012).

Todos estes achados contribuíram para o esclarecimento do mecanismo do desenvolvimento da DMVB, mas os detalhes permanecem desconhecidos. Acredita-se que as lesões que ocorrem em DMVB devem ser ocasionadas devido ao rompimento da homeostase desencadeado pelo transporte iônico defeituoso, tendo

em vista as diversas funções EPR na retina tais como: secreção de hormônios parácrinos; transporte epitelial, fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores (SEF) (HARTZELL et al., 2008).

Se o transporte não acontece corretamente, há a perda da integridade da interface entre o EPR e os fotorreceptores resultando no acúmulo de fluído no espaço sub-retiniano. Esta interface debilitada pode resultar no transporte anormal de retinóide (substância participante do ciclo visual) e prejudicar a fagocitose dos SEF pelo EPR. A partir deste material acumulado, presentes no SEF, há a promoção da formação do A2E e outros componentes da lipofuscina. Esta não é degradada e acumula-se em grânulos, a taxa e nível de acúmulo deve desempenhar o papel na gravidade da doença (**Figura 8**) (BOON et al., 2009; HARTZELL et al., 2008; MARMORSTEIN et al., 2009).

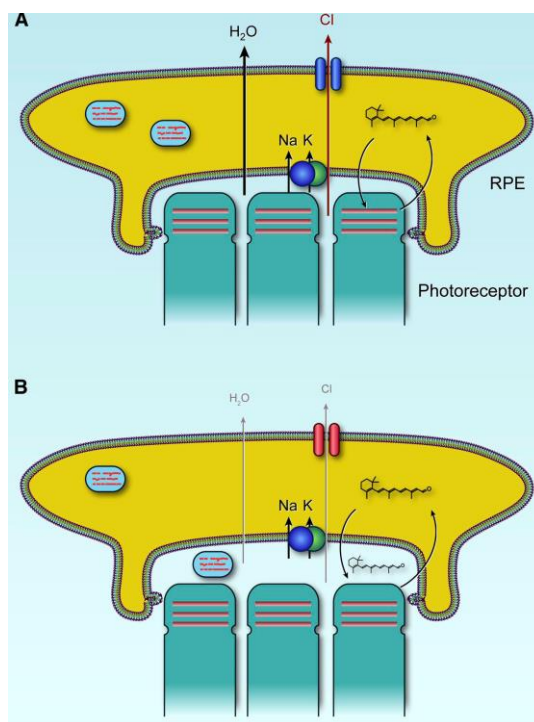


FIGURA 8 – MECANISMO POSTULADO PARA O ACÚMULO DA LIPOFUSCINA EM DMVB. Fonte: HARTZELL et al., 2008.

2.4.1 Topologia da proteína

Dois modelos topológicos similares (localização das estruturas intra e extracelulares e que atravessam a membrana) foram sugeridos para esta proteína. Ambos sugerem que o N e C terminais se localizam no lado intracelular. No modelo

de Tsunenari et al. (2003) a proteína apresenta 5 domínios transmembrana (DTMs, 1, 2, 4, 5 e 6) e apenas um domínio intracelular (DTM 3). O modelo Milenkovic et al. (2007) caracteriza a proteína como tendo 4 DTMs (DTMs 1, 2, 5 e 6) que atravessam a membrana e outros 2 domínios que não a atravessam, mas participam na formação do *loop* intracelular hidrofóbico (DTMs 3 e 4). Este último é o modelo mais aceito. Na **Figura 9** estão representados os dois modelos.

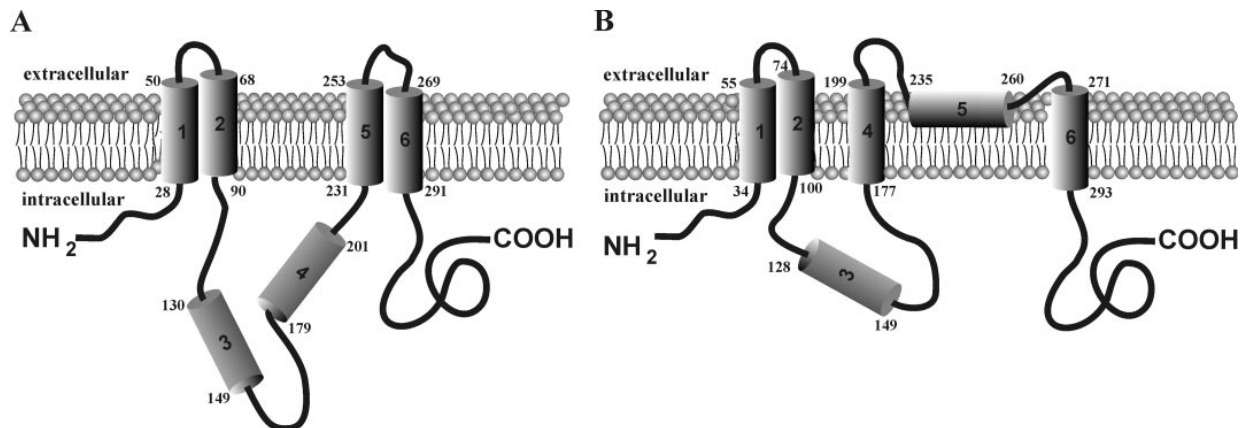


FIGURA 9 - MODELOS TOPOLÓGICOS DA PROTEÍNA BESTROFINA-1.

A: modelo de Milenkovic (2007) apresenta os DTMs 1, 2, 5 e 6 atravessando a membrana e os DTM 3 e 4 formando o loop citoplasmático; **B:** Modelo de Tsunenari (2003) mostra os DTMs 1, 2, 4, 5 e 6 atravessando a membrana formando o loop extracelular e o DTM 3. Fonte: MILENKOVIC, et al.,2007.

Os resíduos do C-terminal onde se encontram a maioria das mutações na bestrofina-1 são altamente conservados, sugerindo que esta porção exerce um crítico papel funcional (BURGESS et al., 2008). No trabalho de Xiao et al. (2008) investigaram 35 mutações sem sentido entre os aminoácidos 293 ao 323 sendo que apenas duas mutações produziram canais funcionais (F298W E T307S).

Em estudo recente, os autores reportaram que os aminoácidos 300 ao 304 na proteína são críticos para seu funcionamento, pois se concentram em torno do canal de Ca^{2+} , alguns fazendo contato físico e outros auxiliando no aumento da concentração de Ca^{2+} . Mutações em alguns destes aminoácidos podem prejudicar a função do canal (DICKSON; PEDI; LONG, 2014).

Acredita-se que as bestrofinas são proteínas homo-oligoméricas (duas ou mais cadeias polipeptídicas idênticas). No entanto desconhece-se qual o número real de subunidades constituintes, podendo ser tetraméricas (BHARILL et al., 2014) ou pentaméricas (SUN et al., 2002).

As bestrofinas são uma família de proteínas relativamente conservadas. Foram descritas primeiramente em *Caenorhabditis elegans*, que apresenta 25 parálogos da bestrofina. Sequências homólogas foram identificadas em animais, fungos, procariotos, mas não em protozoários e plantas. Através de análise filogenética acredita-se que surgiram por duplicação e divergência de uma proteína comum há 700 milhões de anos. Altos níveis de similaridade são encontrados em regiões N-terminais enquanto as C- terminais se diferenciam consideravelmente entre os parálogos (MILENKOVIC et al., 2008). Os DTMs 2, 5 e 6 são altamente conservados da bactéria aos humanos.

3 JUSTIFICATIVA

Padrões de herança e mecanismos genéticos associados à Distrofia Macular Viteliforme de Best são pouco entendidos. Desta forma, a análise do gene *BEST1* poderá contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença. A caracterização das mutações associadas à DMVB poderá ser útil no aconselhamento genético e na clínica oftalmológica gerando informações mais específicas sobre a natureza da doença. Com isso uma melhor orientação ao paciente sobre o componente genético da sua doença e probabilidade desta característica ser transmitida para as próximas gerações. Outra relevância é a caracterização das mutações em famílias brasileiras, considerando-se que não há estudos, até o momento, realizados a respeito de *BEST1* no Brasil. Como perspectiva a elaboração de kits que possam auxiliar no diagnóstico.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar variações nucleotídicas no gene *BEST1* em pacientes com DMVB e seus familiares.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar variantes no gene *BEST1* em pacientes e familiares com DMVB.
- 2) Inferir os padrões de herança e segregação destas variantes nas famílias e sua relação com a DMVB.
- 3) Comparar os dados da variabilidade genética no gene *BEST1* e aqueles disponíveis em banco de dados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 9 pacientes atendidos na Clínica Retina e Vítreo Consultoria em Curitiba-PR e 14 familiares, totalizando 23 indivíduos, pertencentes a 4 famílias não relacionadas entre si. As coletas de amostras sanguíneas para análises genéticas só ocorreram após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas, parecer N° 518.120 em 31/01/2014.

5.2 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E EXTRAÇÃO DE DNA

Na amostras de 8 ml de sangue periférico (2 tubos de 4 ml) foram coletadas de todos os indivíduos. Conforme o protocolo, os tubos com amostras sanguíneas foram submetidos à centrifugação para que ocorra a separação da camada de células mononucleares. Após isso, o DNA foi extraído utilizando-se da técnica de *salting out* de Miller (1988) modificada. Depois da extração, o DNA foi quantificado por absorção óptica, usando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). As concentrações das amostras foram ajustadas em 50 ng/μl de DNA.

5.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *BEST1*

Dez éxons do gene *BEST1* foram amplificados: éxons 1 e 3 ao 11. Foram utilizados 8 pares de *primers* sendo que aqueles que amplificaram os éxons 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11 foram projetados através do programa *Primer 3 Plus* (UNTERGASSER et al., 2012); os pares que amplificaram os éxons 4, 8 e 9 foram descritos por Low et al. (2011). Para verificar a especificidade das sequências foi utilizado o programa *Primer Blast*. Suas respectivas sequências encontram-se na **Tabela 3**.

TABELA 3 - SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE BEST1.

Identificação	Sequência (5' 3')	Éxons	Tamanho do produto (pb)
Best_Ex1_F	CCAAGCAACACCATCCTTTT	1	648
Best_Ex1_R	CTGGGGCACCTTGTACTCAC		
Best_Ex3_F	GAGGCAGTCCCACTCCTACC	3	278
Best_Ex3_R	GCAGCTCCTCGTGATCCTC		
Best_Ex4_F	CTAGGCCCGCTCGCAGCAGAAAGC	4	421
Best_Ex4_R	CTTCCATTCTGCGCGCCCATCTC		
Best_Ex5-6_F	TAAATACCCTGCCCACATGC	5 e 6	951
Best_Ex5-6_R	GGAAGTTCAAAGTCCAGACC		
Best_Ex7_F	TGTGCAAGTCAGAACAAGGC	7	643
Best_Ex7_R	GGAACAAGACAGCCCAACAG		
Best_Ex8-9_F	GCTGGCTTTGAGGAGTTCTGCCTG	8 e 9	756
Best_Ex8-9_R	GTGCTATTCTAAGTTCCTAGGCAG		
Best_Ex10_F	ATGGTGAGGAAGACGGTGTG	10	972
Best_Ex10_R	GTGAGAAAAGGTCCCGAACA		
Best_Ex11_F	GGTTGCAGTGAGATTGAGCA	11	788
Best_Ex11_R	GGCTAATTTCCCATAGCCG		

A amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada no termociclador *Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems)*; os reagentes utilizados na amplificação estão listados nas **Tabelas 4 e 5**. Os detalhes referentes aos ciclos de amplificação estão contidos na **Tabela 6**.

TABELA 4 - REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS 1,3,5,6,7,10 E 11.

REAGENTES	VOLUME
Tampão (10x)	2,50 µL
Primer Forward (10 pmol)	1,25 µl
Primer Reverse (10 pmol)	1,25 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Taq (5 U/µl)	0,20 µl
dNTP (10 mM)	0,50 µl
DNA (50 ng/µl)	2,00 µl
H ₂ O	16,55 µl
Total	25,00 µl

TABELA 5 - REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS 4, 8 E 9.

REAGENTES	VOLUME
Tampão (10x)	2,50 µl
Primer Forward (10 pmol)	0,50 µl
Primer Reverse (10 pmol)	0,50 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Taq (5 U/µl)	0,20 µl
dNTP (10 mM)	0,50 µl
DNA (50 ng/µl)	2,00 µl
H ₂ O	18,05 µl
Total	25,00 µl

TABELA 6 - CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO.

	ÉXON 1	ÉXON 3	ÉXON 4	ÉXON 5-6	ÉXON 7	ÉXON 8-9	ÉXON 10	ÉXON 11	N° DE CICLOS
Denaturação Inicial	94°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	1
Denaturação	94°C 30"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 30"	35
Anelamento	62°C 30"	68°C 30"	64°C 30"	68°C 30"	59°C 30"	64°C 30"	64°C 30"	68°C 30"	
Extensão	72°C 45"	72°C 45"	72°C 45"	72°C 45"	72°C 45"	72°C 45"	72°C 45"	72°C 45"	
Extensão Final	72°C 10'	72°C 10'	72°C 10'	72°C 10'	72°C 10'	72°C 10'	72°C 10'	72°C 10'	1
Resfriamento	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	∞

A confirmação da amplificação foi obtida corando-se as amostras amplificadas com azul de bromofenol e *GelRedTM* (Biotium). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V durante 45 minutos e visualizadas em fototransiluminador (**Figura 10**).

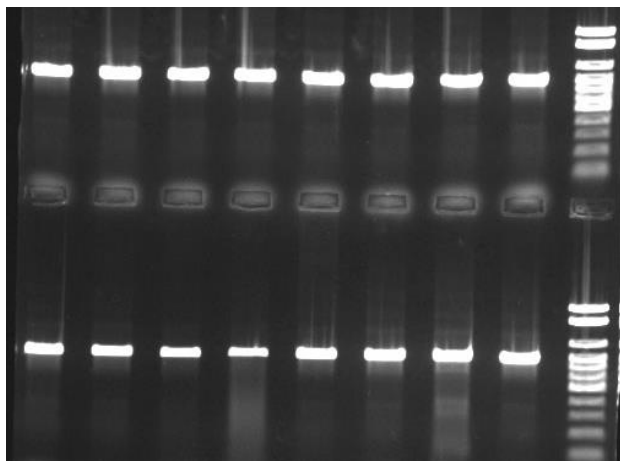


FIGURA 10 - RESULTADO DA CORRIDA ELETROFORÉTICA DO PRODUTO AMPLIFICADO DO ÉXON 10 EM GEL DE AGAROSE 1%.

5.3.1 Purificação dos produtos amplificados para sequenciamento

Após a amplificação dos respectivos éxons, os produtos amplificados foram submetidos a um processo de purificação através da utilização de duas enzimas – Exonuclease I (EXO I) e Fosfatase alcalina de camarão (SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase*). A ação conjunta destas duas enzimas elimina possíveis *primers* não incorporados, DNA simples fita e também dNTPs que restaram ao final da reação de amplificação. Todos estes subprodutos devem ser eliminados pela possível interferência na etapa do sequenciamento. Os reagentes utilizados nesta etapa se encontram na **Tabela 7** e o ciclo de purificação está descrito na **Tabela 8**. Para esta etapa foi utilizado o termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*).

TABELA 7 - PURIFICAÇÃO COM EXO/SAP.

REAGENTES	VOLUME
Tampão	1,0 µl
EXO (1U)	1,0 µl
SAP (10U)	2,0 µl
Amplicon	10,0 µl
Total	14,0 µl

TABELA 8 - CICLOS DE PURIFICAÇÃO.

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO
Ativação da Enzima	37°C	30'
Desativação da Enzima	80°C	15'
Resfriamento	4°C	∞

5.4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GENE *BEST1*

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit de sequenciamento *Big Dye®* v. 3.1 (*Life Technologies*). Os reagentes utilizados nesta etapa se encontram na **Tabela 9** e as condições de ciclagem estão na **Tabela 10**, o aparelho utilizado para o sequenciamento foi o termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*).

TABELA 9 - SEQUENCIAMENTO – ÉXONS 1,3 AO11.

REAGENTES	VOLUME
H ₂ O	4,5 µl
Tampão 10X	1,5 µl
BigDye	1,0 µl
Primer (1,6 pmol)	1,0 µl
DNA Purificado	2,0 µl
Total	10,0 µl

TABELA 10 - CICLOS DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
Denaturação Inicial	96°C	1'	1
Denaturação	96° C	15"	
Anelamento	54°C	15"	35
Extensão	60°C	2'	
Resfriamento	4°C	∞	∞

5.4.1 Eletroforese de capilar

Após a reação de sequenciamento foi realizada a precipitação do DNA sequenciado por meio de acetato de sódio e etanol (absoluto e 70%). Terminada esta última etapa o DNA precipitado foi ressuspensionado em 12 µl de Formamida *Hi-Di*[®] (Life Technologies) e submetido à corrida eletroforética em capilar de 36 cm utilizando o aparelho *ABI Prism 3130* (Applied Biosystems).

5.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os eletroferogramas gerados foram visualizados no programa *Sequencing Analysis* e analisados no programa *SeqScape v.2.6*. Cada *SNP* encontrado foi manualmente anotado e comparado com as bases de dados *dbSNP*.

O alinhamento das sequências proteicas foram feitos utilizando-se a ferramenta online *Mutation Taster* (**Figura 11**).

species	match	gene	aa alignment
Human			134 LLRRTLIRYANLGNVLILRSVSTA
mutated	all conserved		134 LLRRTLIRYANVGNVLILRSVST
Ptrogodytes	all identical	ENSPTRG00000003756	134 LLRRTLIRYANLGNVLILRSVST
Mmulatta	all identical	ENSMUG000000015147	134 LLRRTLIRYANLGNVLILRSVST
Fcatus	not conserved	ENSFCAG00000007380	164 XXXXXXXXXXXXXGNVLILRSVSA
Mmusculus	all identical	ENSMUSG000000037418	134 LLRRTLIRYAILGNVLILRSIST
Ggallus	all identical	ENSGALG00000007217	134 LLRRTLMRYSNLCSVLILRSVST
Trubripes	no homologue		
Drerio	all identical	ENSARG000000078331	134 LIRRLMRYANLSGILIRSVST
Dmelanogaster	all identical	FBgn0040238	135 MMRRTIMRYVCLCLTMVLNVSP
Celegans	all identical	C01B12.3	134 CVRRNCIRYSITQAMVYRDVAA
Xtropicalis	all identical	ENSXETG00000006740	134 MLRRTLMRYANLTLGLILRSVST

FIGURA 11 - EXEMPLO DE ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA BESTROFINA EM DIFERENTES ESPÉCIES. Fonte: *Mutation Taster*.

6 RESULTADOS

6.1 SNPs E INDEL NO GENE *BEST1* EM PACIENTES E FAMILIARES COM DMVB

Os *SNPs* e a variação Indel descritos estão representados em heredogramas e tabelas. Foram encontrados 19 *SNPs* e 1 Indel, todos eles já caracterizados em estudos anteriores e reportados na literatura. Dentre esses, 10 *SNPs* foram observados em região codificante sendo 4 deles mutações não sinônimas ou de sentido trocado (*missense*) e, as 6 restantes, mutações sinônimas. Em regiões intrônicas foram observados 9 *SNPs* e 1 Indel. A relação dos polimorfismos descritos no presente estudo estão na **Tabela 11**.

TABELA 11 - SNPS, NÚMERO NO *dbSNP*, LOCALIZAÇÃO, NATUREZA DA MUTAÇÃO, SIGNIFICADO CLÍNICO E FREQUÊNCIA NAS FAMÍLIAS INVESTIGADAS.

ALTERAÇÃO NUCLEOTÍDICA	Nº <i>dbSNP</i>	EXON / INTRON	ALTERAÇÃO DE AMINOÁCIDO	IMPORTÂNCIA CLÍNICA	FREQUÊNCIA*
c.-599 G>C	rs972355	1	Não	Desconhecida	0,35 (16/46)
c.-329C>T	rs972354	1	Não	Desconhecida	0,22 (10/46)
c.-221T>C	rs972353	1	Não	Desconhecida	0,35 (16/46)
c.201G>C	rs1801393	3	p.Leu67=	Sinônima	0,06 (3/46)
c.400 C>G	-----	4	p.Leu134Val	Prov. Deletéria	0,04 (2/46)
c.422 G>A	rs121918284	4	p.Arg141His	Deletéria	0,06 (3/46)
c.482-24 C>T	rs760306	IVS4	Não	Desconhecida	0,28 (13/46)
c.636+35 T>A	rs202092275	IVS5	Não	Desconhecida	0,02 (1/46)
c.636+44 C>T	rs195162	IVS5	Não	Desconhecida	0,93 (43/46)
c.636+113T>G	rs195161	IVS5	Não	Desconhecida	0,59 (27/46)
c.637-72G>T	rs741886	IV5	Não	Desconhecida	0,04 (2/46)
c.653 G>A	rs281865239	6	p.Arg218His	Deletéria	0,09 (4/46)
c.715-19_715-18insTCCTCCTCC	rs113492158	IVS6	Não	Desconhecida	0,91 (42/46)
c.910 G>A	Não possui	8	p.Asp304Asn	Deletéria	0,09 (4/46)
c.1023 C>T	rs1801390	9	p.Pro341=	Sinônima	0,13 (6/46)
c.1410G>A	rs149698	10	p.Thr 470=	Sinônima	0,37 17/46
c.1557C>T	rs1800008	10	p.Ser519=	Sinônima	0,02 (1/46)
c.1608T>C	rs1800009	10	p.Thr536=	Sinônima	0,13 (6/46)
c.1740-42G>T	rs195155	IVS10	Não	Desconhecida	1 (46/46)
c.*133T>C	rs1801621	11	Não	Desconhecida	0,11 (5/46)

*ENTRE PARÊNTESES O NÚMERO DE ALELOS.

c. = codificante

p.= proteína

IVS= *Intervening sequence*

c.715-19_715-18insTCCTCCTCC – uma inserção de 9 pares de base entre o nucleotídeo 18 e 19 anteriores ao início do éxon 7.

FAMÍLIA 1:

Na família 1 foram identificados 5 *SNPs*, 3 localizados em região codificante; sendo 2 deles relacionados a mutações de sentido trocado (Leu134**Val** e Arg141**His**) e 1 mutação sinônima; 2 *SNPs* em regiões intrônicas; 1 Indel (**Tabela 12**). Abaixo estão representados os familiares portadores das mutações Leu134Val e Arg141His e o paciente que manifesta a DMVB (**Figura 12**). A genotipagem do indivíduo II-2 foi repetida e confirmou-se o genótipo posição c.1410 GG, contrariando a segregação mendeliana.

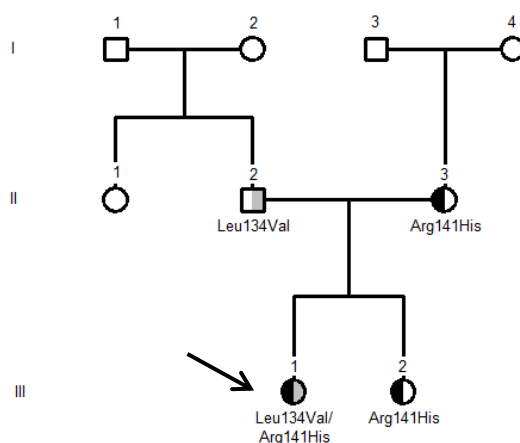


FIGURA 12 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 1.

A seta está indicando o probando.

TABELA 12 - *SNPs* E INDEL GENOTIPADOS NA FAMÍLIA 1.

Indiv.	<i>SNPs</i>						INDEL
	REGIÃO CODIFICANTE			REGIÃO INTRÔNICA			
	c.400 C>G p.Leu134Val rs972355	c.422 G>A p.Arg141His rs121918284	c.1410G>A p.Thr47= rs149698	c.636+44 C>T rs195162	c.636+113 T>G rs195161	c.715-19_715- 18insTCCTCCTCC	
II-1	CG	GG	GA	CT	TG		Heteroz.
II-2	GG	GA	AA	TT	GG		Homoz..
III-1	CG	GA	AA	TT	GG		Homoz.
III-2	GG	GA	GG	TT	TG		Heteroz.

Homoz.= Homozigoto; Heteroz= heterozigoto
c.= codificante; p.= proteína

FAMÍLIA 2:

Na família 2 foram identificados 10 *SNPs*; 3 localizados em região codificante (mutações sinônimas), 7 mutações em região intrônica e 1 Indel (**Tabela 13**). Abaixo está representado o heredograma desta família (**Figura 13**), os pacientes estão marcados em preto.

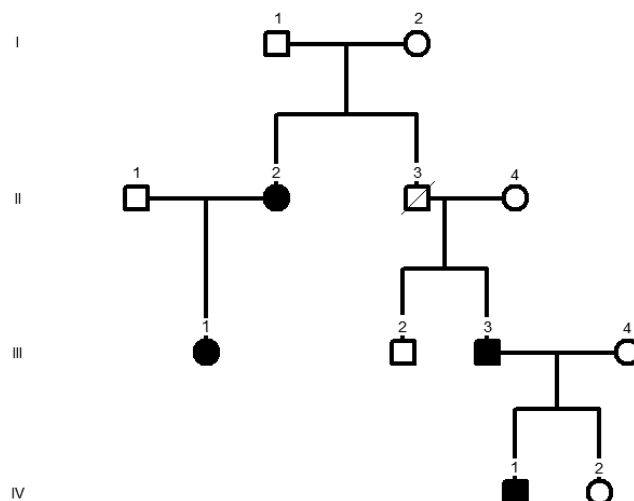


FIGURA 13 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 2.

A paciente III-1 não foi genotipada.

TABELA 13 - *SNPs* E INDEL ENCONTRADOS NA FAMÍLIA 2.

Indiv.	<i>SNPs</i>										INDEL
	REGIÃO CODIFICANTE				REGIÃO INTRÔNICA						
	c.201G>C p.Leu67= rs149698	c.1023 C>T p.Pro341= rs1801390	c.1410G>A p.Thr470= rs149698	c.-599 G>C rs972355	c.-329C>T rs972354	c.-221T>C rs972353	c.482-24 C>T rs760306	c.636+35 T>A rs202092275	c.636+44 C>T rs195162	c.636+113 T>G rs195161	
II-2	GG	CT	GG	GC	CT	TC	CT	TA	TT	TG	Homoz.
II-4	GG	-	GA	GC	CC	TC	CT	TT	TT	TG	Homoz.
III-2	GG	CC	GG	CC	CT	CC	TT	TT	TT	TT	Homoz.
III-3	GG	CT	GA	GC	CT	TC	CT	TT	TT	TG	Homoz.
III-4	GC	CC	GA	GC	CC	TC	CC	TT	TT	GG	Homoz.
IV-1	GC	CC	GG	CC	CC	CC	TT	TT	TT	TT	Homoz.
IV-2	GC	CC	GG	CC	CT	CC	TT	TT	TT	TT	Homoz.

Homoz. = Homozigoto; c.= codificante; p.=proteína

FAMÍLIA 3

Na família 3 foram detectadas 12 *SNPs*; 4 localizados em região codificante, 1 mutação de sentido trocado e 3 sinônimas; 8 em região intrônica e 1 Indel (**Tabela 14**). Abaixo está representado os familiares portadores da mutação de sentido trocado Asp304Asn (**Figura 14**).

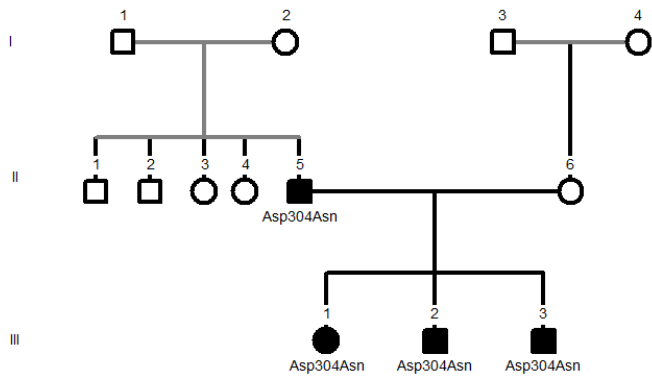


FIGURA 14 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 3.

TABELA 14 - *SNPS* E INDEL ENCONTRADOS NA FAMÍLIA 3.

	SNPs												INDEL		
Indiv.	REGIÃO CODIFICANTE					REGIÃO INTRÔNICA									
	c.910 G>A	p.Asp304Asn	c.1410G>A	p.Thr 470=	c.1557C>T p.Ser519=	c.1608T>C p.Thr536=									
							c.-599 G>C	c.-329C>T	c.-221T>C	c.482-24 C>T	7222C>T c.636+44 C>T	c.636+113 T>G	c.637-72G>T	c.*133T>C	c.715-19_715-18insTCCTCCTCC
II-5	GA	GG	CC	TT			GC	CT	TC	CT	TT	TG	GG	TT	Homoz.
II-6	GG	GA	CT	TT			GG	CT	TC	CT	TC	TT	GT	TT	Homoz.
III-1	GA	G/A	CC	TT			GC	CT	TC	CT	TC	TG	GT	TT	Heteroz.
III-2	GA	G/G	CC	TT			GC	CT	TC	CT	TT	TG	GG	TT	Homoz.
III-3	GA	GG	CC	TC			GC	CC	TT	CC	TT	TG	GG	TC	Heteroz.

Homoz. = Homozigoto; Heteroz.= heterozigoto
c.= codificante; p.=proteína

FAMÍLIA 4

Nesta família foram encontrados 10 *SNPs*; 4 em região codificante, que resultaram em 1 mutação de sentido trocado e 3 sinônimas; 6 em região intrônica e 1 Indel (**Tabela 15**). Abaixo estão representados os familiares portadores da mutação Arg218His (**Figura 15**).

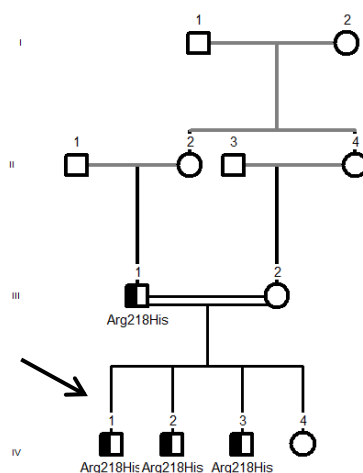


FIGURA 15 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 4.

A seta está indicando o probando.

TABELA 15 - *SNPs* E INDEL OBSERVADOS NA FAMÍLIA 4.

Indiv.	<i>SNPs</i>										INDEL
	REGIÃO CODIFICANTE					REGIÃO INTRÔNICA					
	c.653 G>A p.Arg218His	c.1023 C>T p.Pro341=	c.1410G>A p.Thr 470=	c.1608>C p.Thr536=	c.-599 G>C	c.-329C>T	c.-221T>C	c.482-24 C>T	c.636+113 T>G	c.*133C>T	
III-1	GA	CC	GA	TC	GG	CC	TT	CC	GG	TC	Homoz.
III-2	GG	CC	GA	TC	GC	CC	TC	CT	TG	TC	Homoz.
III-3	GG	CT	GG	TT	GC	CT	TC	CT	TG	TT	Homoz.
IV-1	GA	CC	GA	TC	GG	CC	TT	CC	GG	TC	Homoz.
IV-2	GA	CC	GA	TC	GG	CC	TT	CC	GG	TT	Homoz.
IV-3	GA	CC	GA	TC	GG	CC	TT	CC	GG	TC	Homoz.
IV-4	GG	CC	AA	TT	GG	CC	TT	CC	GG	TT	Homoz.

Homoz. = Homozigoto; c.= codificante; p.=proteína; F010* = irmão de I-2, não representado no heredograma.

6.2 SEGREGAÇÃO DOS SNPs E INDEL NAS FAMÍLIAS E SUA RELAÇÃO COM A DMVB

Muito embora o número de famílias tenha sido insuficiente para análises de segregação mais robustas, em algumas destas famílias foi possível relacionar a presença da mutação com alguns sinais clínicos, mediante a observação e relação da mutação com a característica na geração parental e subsequentes gerações.

6.3 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA PROTEICA DO GENE *BEST1*

O alinhamento das sequências proteicas e comparações entre diferentes espécies foram realizadas para atestar o estado de conservação dos aminoácidos e o caráter mutacional nas famílias investigadas. Pode-se observar a seguir que a sequência é altamente conservada.

FAMÍLIA 1: MUTAÇÕES LEU134VAL E ARG141HIS

species	match	gene	aa alignment
Human			134 LLRRTLIRYANLGNVLILRSVSTA
mutated	all conserved		134 LLRRTLIRYANVGNVLILRSVST
Ptrogodytes	all identical	ENSPTRG00000003756	134 LLRRTLIRYANLGNVLILRSVST
Mmulatta	all identical	ENSMUG000000015147	134 LLRRTLIRYANLGNVLILRSVST
Fcatus	not conserved	ENSFCAG00000007380	164 XXXXXXXXXXXXGNVLILRSVSA
Mmusculus	all identical	ENSMUSG000000037418	134 LLRRTLIRYAILGQVLILRSIST
Ggallus	all identical	ENSGALG00000007217	134 LLRRTLMRYSNLCVLIILRSVST
Trubripes	no homologue		
Drerio	all identical	ENSARG000000078331	134 LIRRSMLRYANLSGILIYRSVST
Dmelanogaster	all identical	FBgn0040238	135 MMRRTIMRYVCLCLTMVLANVSP
Celegans	all identical	C01B12.3	134 CVRRNCIRYSITQAMVYRDVAA
Xtropicalis	all identical	ENSXETG00000006740	134 MLRRTLMRYSNLTGLLILRSVST

L= LEUCINA (LEU)

species	match	gene	aa alignment
Human			141 RYANLGNVLILRSVSTAVYKRFP
mutated	not conserved		141 RYANLGNVLILHSVSTAVYKRFP
Ptrogodytes	all identical	ENSPTRG00000003756	141 RYANLGNVLILRSVSTAVYKRFP
Mmulatta	all identical	ENSMUG000000015147	141 RYANLGNVLILRSVSTAVYKRFP
Fcatus	all identical	ENSFCAG00000007380	171 XXXXXGNVLILRSVSAVYKRFP
Mmusculus	all identical	ENSMUSG000000037418	141 RYAILGQVLILRSISTSVYKRFP
Ggallus	all identical	ENSGALG00000007217	141 RYSNLCVLIILRSVSTAVYKRFP
Trubripes	no homologue		
Drerio	all identical	ENSARG000000078331	141 RYANLSGILIYRSVSTAVYKRFP
Dmelanogaster	not conserved	FBgn0040238	142 RYVCLCLTMVLANVSPRVKKRFP
Celegans	all identical	C01B12.3	141 RYSILTQAMVYDVAASVRKRFP
Xtropicalis	all identical	ENSXETG00000006740	141 RYANLTGLLILRSVSTAVYMRFP

R= ARGININA (ARG)

FAMÍLIA 3: MUTAÇÃO ASP304ASN.

species	match	gene	aa	alignment
Human			304	QLINPFGEDDDDFETNWIVDRNLQ
mutated	all conserved		304	DDD N FETNWIVDRNL
Ptroglyotes	all identical	ENSPTRG00000003756	304	DDD D FETNWIVDRNL
Mmulatta	all identical	ENSMUG00000015147	304	DDD D FETNWIVDRNL
Fcatus	all identical	ENSFCAG0000007380	334	QLINPFGEDDD D FETNWIVDRSL
Mmusculus	all identical	ENSMUSG00000037418	304	DDD D FETNWIIDRNL
Ggallus	all identical	ENSGALG0000007217	304	DDD D FETNWLIDRNL
Trubripes	no homologue			
Drerio	all identical	ENSDARG00000078331	304	DDD D FETNWLIVDRNL
Dmelanogaster	all identical	FBgn0040238	311	LINPFGEDDD D FEVNWMVDRNL
Celegans	all identical	C01B12.3	307	LGEDDD D FECNWILDRNL
Xtropicalis	all identical	ENSXETG0000006740	304	DDD D FETNWLIDRNL

D= ASPARAGINA (ASP)

FAMÍLIA 4: MUTAÇÃO ARG218HIS.

species	match	gene	aa	alignment
Human			218	LQSLLNEMNTLR T QCGHLYAYDWI
mutated	not conserved		218	LQSLLNEMNTLR H TQCGHLYAYDW
Ptroglyotes	all identical	ENSPTRG00000003756	218	LQSLLNEMNTLR R TQCGHLYAYDW
Mmulatta	all identical	ENSMUG00000015147	218	LQSLLNEMNTLR R TQCGHLYAYDW
Fcatus	all identical	ENSFCAG0000007380	248	LQSLLNEMNVL R TQCGLLFAY
Mmusculus	all identical	ENSMUSG00000037418	218	LQSLMNEVCTLR R TQCGQLYAYDW
Ggallus	all identical	ENSGALG0000007217	218	LQGILNELNLT R SQCGRLYGYDW
Trubripes	no homologue			
Drerio	all identical	ENSDARG00000078331	218	MTAILNELNLT R SQCMRLYGYDW
Dmelanogaster	all identical	FBgn0040238	220	VKTIIDELNKF R GQCGLLISYDT
Celegans	all identical	C01B12.3	218	YVDLMCKMRQF R VNILLSLTLFDW
Xtropicalis	all identical	ENSXETG0000006740	218	LQLILKELNSL R TQCGRLYGYDW

R= ARGININA (ARG)

7 DISCUSSÃO

FAMÍLIA 1

A paciente heterozigota composta (II-1) apresenta duas mutações de sentido trocado: Leu134Val e Arg141His, sendo apenas esta última relacionada à doença.

A mutação Leu134**Val** foi relatada em três trabalhos anteriores (MARCHANT et al., 2007; BOON et al., 2007; BOOIJ et al., 2010). Marchant e colaboradores foram os primeiros a descrevê-la e relatar que afetava um resíduo de aminoácido conservado na cadeia proteica. Boon et al. (2007) a encontrou associada com a mutação Ala195Val em casos de DVM e BOOIJ et al. (2010) encontrou a mesma combinação (Leu134Val e Ala195Val) em um caso de DMVB. Observando o padrão de segregação nesta família, não foi possível observar a variante segregando com a doença, visto que o seu pai (I-1) portador desta mutação não apresenta DMVB.

A substituição relatada não muda a natureza do aminoácido, pois tanto leucina quanto valina são polares (MARCHANT et al., 2007). Sabe-se que esse resíduo está localizado entre o DTM 2 e 3 (aminoácido 130 ao 149) e que faz parte do loop citoplasmático (MILENKOVIC et al., 2007). Entretanto, desconhece-se o impacto dessa mutação. Filogeneticamente, a substituição de um aminoácido altamente conservado (Leu), permite hipotetizar sobre sua importância na função da bestrofina.

A mutação Arg141**His** foi descrita primeiramente por Kramer et al., (2000) em um indivíduo com uma mutação intrônica (IVS5G>C) e Lotery et al. (2000) que não detalhou a ocorrência. Em ambos os trabalhos a presente mutação não foi encontrada em controles saudáveis. Vários outros trabalhos também descreveram casos de mutações bialélicas associadas com a mutação Arg141His. No estudo de Kinnick et al. (2011) os autores apresentaram pacientes diagnosticados com DMVAR, portadores desta mutação juntamente com a Pro152Ala e outro com Ala195Val. Schatz et al. (2006) observaram um caso de uma família na qual a referida mutação está presente juntamente com uma mutação sem sentido, Tyr29stop, em duas irmãs e o autor denominou o caso como DMVB atípico. Em outro trabalho relataram um caso de homozigose para a referida mutação, quadro

clínico condizente com BAR (MACDONALD et al., 2012). Avaliando o padrão de segregação para esta mutação, a mãe (I-2) portadora da mutação, assim como pai também não apresenta sinais clínicos da DMVB e, portanto não foi possível observar a segregação da mutação com a doença. A irmã da paciente (II-2) também é portadora desta mutação.

Quanto ao padrão de herança, foi possível observar um padrão autossômico recessivo nesta família, haja visto que os pais, ambos portadores isolados de uma das mutações, são indivíduos normais. Mutações nesta região, afetando os aminoácidos 141 e 289, estão associadas à forma recessiva, como observada no trabalho de Kinnick et al. (2011).

Assim como o aminoácido 134, este também está localizado entre o DTM 2 e 3. A alteração (arginina para histidina) não muda drasticamente a carga elétrica, pois ambos são carregados positivamente. Entretanto, trata-se de um resíduo consideravelmente conservado e relativamente importante para função, como atestado no estudo de Burgess et al. (2008).

Estudos funcionais em cultura de células têm revelado que a proteína com a mutação Arg141His, sem o alelo selvagem resulta em fenótipo nulo, desta forma abolindo por completa a atividade do canal de Cl⁻. Isso se deve porque esta mutação não apresenta o efeito dominante negativo, como visto em outras e, portanto esta mutação associada ao alelo selvagem é capaz de produzir quantidade de proteína suficiente (BURGESS et al., 2008). Foi possível observar esta constatação nesta família, pois apenas a paciente possui as duas mutações e os demais membros apresentam apenas uma delas associada com o alelo selvagem e são assintomáticos.

Casos de heterozigotos compostos até o momento têm sido relatados na maioria em casos de BAR (BURGESS et al., 2008; MACDONALD et al., 2012; POMARES et al., 2012; SHARON et al., 2014). Acredita-se que seja caso desta paciente, pois se trata de um caso atípico a qual não possui as lesões viteliformes típicas, condizente com BAR, e EOG anormal com IA de 1,0. Outra característica de BAR é o ERG (eletroretinograma) anormal, também apresentado por esta paciente.

Curiosamente, seus pais também apresentam anormalidades no EOG, seu pai (I-1) em ambos os olhos e sua mãe no olho direito.

Quatro recentes evidências comprovaram que é possível herdar DMVB em uma forma recessiva. Como é o caso de 4 famílias de heterozigotos compostos (incluindo mutações de sentido trocado e de mudança de matriz de leitura) (KINNICK et al., 2011). Em outro caso um paciente afetado pela mutação Arg141His e outro alelo pela mutação Arg141Ser (IANNACCONE et al., 2011), terceiro caso de 2 afetados em uma família homozigotos para mutação de mudança de matriz de leitura Leu472ProfsX10 (BITNER et al., 2011). O quarto caso, 3 irmãos heterozigotos compostos para as mutações L41P e I201T (ZHAO et al., 2012). Considerando as mutações encontradas e os relatos na literatura o diagnóstico é compatível com BAR, no entanto novas avaliações oftalmológicas são necessárias para confirmação do diagnóstico. Esse caso em especial retrata a importância da correlação genótipo e fenótipo.

FAMÍLIA 2

Nesta família nenhuma mutação foi encontrada na região codificante; entretanto o éxon 2 não foi amplificado, daí a impossibilidade de se afirmar a inexistência de mutação em região codificante. O padrão de herança parece ser consistente com padrão dominante, entretanto não há informações disponíveis quanto a ocorrência em gerações anteriores.

Recentemente foi delimitada a região promotora suficiente para a expressão do gene na EPR (-154 a + 38 pb) (ESUMI et al., 2007). Apesar de alguns trabalhos relatarem mutações na região promotora e intrônica, até o momento não foi possível confirmar a relação entre as mutações nesta região com a doença.

Trata-se de uma família com ascendência alemã, sem resultados do EOG e com características típicas, quanto o padrão de lesão de DMVB.

FAMÍLIA 3

A família apresenta a mutação Asp304**Asn** em heterozigose, até o momento ela não se encontra descrita em nenhum trabalho, apenas indexada nas bases de dados *Vision Database* - Universidade de Iowa e Retina Internacional. Segundo Edwin Stone da Universidade de Iowa, responsável pelo estudo, esta mutação foi encontrada em apenas um indivíduo com sinais clínicos de DMVB (informação pessoal). No nosso trabalho foi encontrada nos 4 indivíduos portadores de DMVB, pai e os 3 filhos afetados pela doença. Observando o padrão de segregação, pode-se observar que esta mutação segrega com a doença, pois o pai (I-1) portador da mutação e da DMVB e os seus filhos (II-1; II-2 e II-3) herdaram o alelo mutado e desta forma, apresentam a doença. Portanto é possível identificar o padrão dominante comumente visto em DMVB nesta família. O aminoácido 304, como os demais vistos até o momento, é conservado e as características funcionais serão abordadas a seguir. Este aminoácido se encontra na região C-terminal da proteína.

No estudo de Dickson; PEDI; Long (2014) os aminoácidos Asp301 e Asp304 são ligantes do Ca^{2+} e os aminoácidos ao redor auxiliam aumentando a sua concentração (região chamada de Ca^{2+} *clasp*). Mutações nestes aminoácidos são conhecidas por prejudicar a função do canal e são relativamente prevalentes nas bestrofinopatias (TSUNENARI et al., 2006; XIAO et al., 2008; QU et al., 2006; DICKSON, PEDI e LONG, 2014). As mesmas estão contidas dentro da região chamada de *hotspots* (WHITE, MARQUARDT e WEBER, 2000). A região terminal, onde estão contidas estas mutações, também é crítica na formação do canal, pois a interação N e C terminais é requerida para funcionamento da bestrofina-1. Estas mutações se apresentam com efeito dominante negativo, que deve ocorrer porque a bestrofina-1 se combina para formar canais heteroméricos e a associação das duas subunidades, mutantes e normais, à torna não funcional (QU et al., 2009).

No trabalho de Kranjac et al. (2009) foi avaliada a função da sequência de aminoácidos asparagina na região terminal trocando estes aminoácidos por alanina, e conclui que os aminoácidos 301 e 304 afetam dramaticamente o canal reduzindo a atividade de Ca^{2+} , por razões comentadas acima. Portanto a substituição do aminoácido asparagina, que é carregado negativamente, por ácido aspártico, que é polar, no aminoácido 304 prejudica o funcionamento da proteína e provavelmente

responsável pelo fenótipo da doença. Os exames disponíveis de fundo de olho revelam possuir lesões típicas de DMVB. Até o momento não existe resultado do EOG para estes pacientes.

FAMÍLIA 4

Apenas o pai é portador da mutação Arg218**His** (R218H), a qual foi herdada pelos 3 filhos (II-1; II-2; II-3). Apenas o probando II-3 é afetado pela DMVB. A mutação R218H foi descrita pela primeira vez por Lotery et al. (2000) que encontraram em uma família e em um caso isolado. Também encontraram outra mutação no mesmo aminoácido R218C, que mostra ser mais prevalente em casos de DMVB com histórico familiar. No estudo de Marchant et al. (2001) a mutação R218H foi encontrada em um paciente e em seu pai, este com 72 anos de idade e que não possuía nenhuma alteração visual, concluíram que está relacionada com variedade fenotípica dentro das famílias. No estudo posterior de Marchant et al. (2007) a mutação R218H foi novamente relatada em 2 famílias e em 3 casos isolados.

Pode-se observar que a mutação não segregou com a doença, o que poderia ser atribuído a outros fatores como, por exemplo, a penetrância incompleta. Os pais são primos em primeiro grau caracterizando uma relação consanguínea, entretanto, não foi observado o padrão de recessividade (os portadores são heterozigotos) para esta mutação como é comum nos casamento entre indivíduos aparentados. O aminoácido 218 é conservado, neste caso a arginina que possui carga positiva é alterada pela histidina que apresenta um anel imidazol que provavelmente altera a estrutura secundária ou terciária da proteína (MARCHANT et al., 2001). Essa diferença química possivelmente afeta a função da proteína e a faz perder a capacidade de funcionar como canal de ânion, como acontece com a mutação R218C (MILENKOVIC et al., 2011).

A penetrância incompleta observada pode ser consequência da ação de genes modificadores e fatores ambientais ainda não conhecidos. Como não existem relatos de estudos de expressão com esta mutação, não é possível afirmar o efeito no funcionamento da proteína. Neste caso os pais são primos de primeiro grau

caracterizando uma relação consanguínea, entretanto, não foi observado o padrão de recessividade como é visto em casos de casamento entre indivíduos aparentados.

Apenas o paciente apresenta quadro clínico da doença e os sintomas comuns, como padrão de lesão e o valor de EOG de 1,5. Porém os demais membros da família não foram submetidos aos exames oftalmológicos específicos e não é possível afirmar a inexistência de alguma anormalidade (apenas o irmão II-1 apresentou nos primeiros meses de vida glaucoma congênito) como alteração de fundo de olho ou pico do EOG diminuído.

8 CONCLUSÃO

- Das 4 famílias analisadas (total de 9 indivíduos portadores de DMVB) apenas em uma (contendo 3 portadores) não foi identificado o *SNP* associado a mutação na região codificante. Pelo fato do éxon 2 não ter sido amplificado é possível que exista alguma variação nucleotídica nesta região.
- As variações nucleotídicas mais frequentes ocorreram nos éxons 4, 6 e 8 concordando com os relatos da literatura os quais afirmam que a maioria das mutações se encontram nestes éxons.
- Vários *SNPs* foram identificados especialmente nas regiões intrônicas e alguns deles próximas aos éxons. Mais estudos são necessários para relacioná-los com a ocorrência da doença.
- Diferentes padrões de herança foram observados nas 3 famílias portadoras de mutações na região codificante: na família 1, o provável padrão de herança seria recessivo, sendo a paciente heterozigota composta; nas famílias 3 e 4 padrão autossômico dominante, nesta última podendo-se observar penetrância incompleta.
- Apenas na família 3 pode-se observar a mutação segregando com a doença; no entanto seria necessário o estudo em mais famílias para comprovar esse achado.
- No que se refere a família 1 nossos resultados auxiliaram com a avaliação clínica do paciente uma vez que a caracterização da mutação permitiu mudar o diagnóstico de DMVB para bestrofinopatia autossômica recessiva, criando desta forma correlação mais acurada genótipo-fenótipo.
- Todos os aminoácidos relacionados com os *SNPs* associados a mutações são conservados e, portanto, devem ser relevantes para a função proteica.
- Este é o primeiro estudo brasileiro que analisou o gene *BEST1* em pacientes com DMVB. Mais estudos são necessários para caracterização da amostra brasileira.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas mutações foram descritas no gene *BEST1* desde que foi descrito em 1998. Com o avançar dos estudos e o melhor entendimento dos mecanismos de regulação do gene, juntamente com possíveis genes modificadores há perspectivas de se correlacionar mutações em regiões promotoras, intrônicas e novos sítios de *splicing* com a doença. Esses dados somados a novos achados sobre a função da proteína poderão auxiliar na elucidação do mecanismo fisiopatológico, na contribuição do gene *BEST1* no acúmulo da lipofuscina e no LP, e futuramente no desenvolvimento de novos tratamentos.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLIKMETS, R. et al. **Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies.** Human genetics, v. 104, p. 449-453, 1999.
- ARDEN, G. B.; BARRADA, A.; KELSEY, J. H. **New clinical test of retinal function based upon the standing potential of the eye.** The British journal of ophthalmology, v. 46, p. 449-467, 1962.
- ATCHANEEYASAKUL, L. O. et al. **Mutation analysis of the VMD2 gene in thai families with best macular dystrophy.** Ophthalmic Genet, v. 29, n. 3, p. 139-44, Sep 2008.
- BAKALL, B. et al. **The mutation spectrum of the bestrophin protein--functional implications.** Hum Genet, v. 104, n. 5, p. 383-9, May 1999.
- BAKALL, B. et al. **Enhanced accumulation of A2E in individuals homozygous or heterozygous for mutations in BEST1 (VMD2).** Experimental Eye Research, v. 85, p. 34-43, 2007.
- BARRO-SORIA, R.; ALDEHNI, F.; ALMACA, J.; WITZGALL, R.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K. **ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel.** Pflugers Arch, v. 459, n. 3, p. 485-97, Feb 2010.
- BARRO SORIA, R.; SPITZNER, M.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K. **Bestrophin-1 enables Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in epithelia.** J Biol Chem, v. 284, n. 43, p. 29405-12, Oct 23 2009.
- BEST, F. **Über eine hereditäre Maculaaffektion.** Zeitschrift für Augenheilkunde, v. 13, n. 3, p. 199-212, 1905.
- BHARILL, S.; FU, Z.; PALTY, R.; ISACOFF, E. Y. **Stoichiometry and specific assembly of Best ion channels.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 111, p. 6491-6, 2014.
- BITNER, H.; MIZRAHI-MEISSONNIER, L.; GRIEFNER, G.; ERDINEST, I.; SHARON, D.; BANIN, E. **A homozygous frameshift mutation in BEST1 causes the classical form of best disease in an autosomal recessive mode.** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 52, p. 5332-5338, 2011.

- BITNER, H.; SCHATZ, P.; MIZRAHI-MEISSONNIER, L.; SHARON, D.; ROSENBERG, T. **Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark.** Am J Ophthalmol, v. 154, n. 2, p. 403-412 e4, Aug 2012.
- BOOIJ, J. C. et al. **Course of visual decline in relation to the Best1 genotype in vitelliform macular dystrophy.** Ophthalmology, v. 117, n. 7, p. 1415-22, Jul 2010.
- BOON, C. J. et al. **Clinical and genetic heterogeneity in multifocal vitelliform dystrophy.** Arch Ophthalmol, v. 125, n. 8, p. 1100-6, Aug 2007.
- BOON, C. J. F.; KLEVERING, B. J.; LEROY, B. P.; HOYNG, C. B.; KEUNEN, J. E. E.; DEN HOLLANDER, A. I. **The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene.** Progress in Retinal and Eye Research, v. 28, p. 187-205, 2009.
- BOON, C. J. F. et al. **Autosomal recessive bestrophinopathy: Differential diagnosis and treatment options.** Ophthalmology, v. 120, p. 809-820, 2013.
- BRUNETTE, J. **The human electroretinogram during dark adaptation: Implicit time and amplitude studies.** Archives of Ophthalmology, v. 82, n. 4, p. 491-498, 1969.
- BURGESS, R. et al. **Biallelic Mutation of BEST1 Causes a Distinct Retinopathy in Humans.** American Journal of Human Genetics, v. 82, p. 19-31, 2008.
- CALDWELL, G. M. et al. **Bestrophin gene mutations in patients with Best vitelliform macular dystrophy.** Genomics, v. 58, p. 98-101, 1999.
- CASCAVILLA, M. L.; QUERQUES, G.; STENIRRI, S.; BATTAGLIA PARODI, M.; QUERQUES, L.; BANDELLO, F. **Unilateral vitelliform phenotype in autosomal recessive bestrophinopathy.** Ophthalmic Research, v. 48, p. 146-150, 2012.
- CHIEN, L.-T.; ZHANG, Z.-R.; HARTZELL, H. C. **Single Cl⁻ channels activated by Ca²⁺ in Drosophila S2 cells are mediated by bestrophins.** The Journal of general physiology, v. 128, p. 247-259, 2006.
- CHIEN, L. T.; HARTZELL, H. C. **Drosophila bestrophin-1 chloride current is dually regulated by calcium and cell volume.** J Gen Physiol, v. 130, n. 5, p. 513-24, Nov 2007.

- CHIEN, L. T.; HARTZELL, H. C. **Rescue of Volume-regulated Anion Current by Bestrophin Mutants with Altered Charge Selectivity.** The Journal of General Physiology, v. 132, n. 5, p. 537-546, Nov 2008.
- DAVIDSON, A. E. et al. **Missense Mutations in a Retinal Pigment Epithelium Protein, Bestrophin-1, Cause Retinitis Pigmentosa.** American Journal of Human Genetics, v. 85, p. 581-592, 2009.
- DEUTMAN, A. F. **Electro-oculography in families with vitelliform dystrophy of the fovea. Detection of the carrier state.** Archives of ophthalmology, v. 81, p. 305-316, 1969.
- DICKSON, V. K.; PEDI, L.; LONG, S. B. **Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel.** Nature, v. 516, n. 7530, p. 213-8, Dec 11 2014.
- DUTA, V.; DUTA, F.; PUTTAGUNTA, L.; BEFUS, A. D.; DUSZYK, M. **Regulation of basolateral Cl(-) channels in airway epithelial cells: the role of nitric oxide.** The Journal of membrane biology, v. 213, p. 165-174, 2006.
- ELDRED, G. E. **Lipofuscin fluorophore inhibits lysosomal protein degradation and may cause early stages of macular degeneration.** Gerontology, v. 41 Suppl 2, p. 15-28, 1995.
- ENSEMBL. Disponível em: < <http://www.ensembl.org> >.
- ESUMI, N.; KACHI, S.; CAMPOCHIARO, P. A.; ZACK, D. J. **VMD2 promoter requires two proximal E-box sites for its activity in vivo and is regulated by the MITF-TFE family.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, p. 1838-1850, 2007.
- ESUMI, N. et al. **BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family members.** Human Molecular Genetics, v. 18, p. 128-141, 2009.
- ESUMI, N.; OSHIMA, Y.; LI, Y.; CAMPOCHIARO, P. A.; ZACK, D. J. **Analysis of the VMD2 Promoter and Implication of E-box Binding Factors in Its Regulation.** Journal of Biological Chemistry, v. 279, p. 19064-19073, 2004.
- FERRARA, D. C. **Implicações Fisiopatológicas da Avaliação Ocular Multimodal em Distrofia Macular Viteliforme de Best.** (Doutorado). Programa de Pós-

Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2010.

FINNEMANN, S. C.; LEUNG, L. W.; RODRIGUEZ-BOULAN, E. **The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n. 6, p. 3842-7, Mar 19 2002.

FISCHMEISTER, R.; HARTZELL, H. C. **Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels.** The Journal of physiology, v. 562, p. 477-491, 2005.

FORSMAN, K. et al. **The gene for Best's macular dystrophy is located at 11q13 in a Swedish family.** Clinical Genetics, v. 42, n. 3, p. 156-9, Sep 1992.

FRANGIEH, G. T.; GREEN, W. R.; FINE, S. L. **Histopathologic Study of Best ' s Macular Dystrophy.** v. 21205, 1982.

FRENNESSON, C. I.; WADELIUS, C.; NILSSON, S. E. **Best vitelliform macular dystrophy in a Swedish family: genetic analysis and a seven-year follow-up of photodynamic treatment of a young boy with choroidal neovascularization.** Acta Ophthalmol, v. 92, n. 3, p. 238-42, Feb 2013.

GASS, J. D. M. **Heredodystrophic disorders affecting the pigment epithelium and retina.** In: Gass, J.D.M. (Ed.). **Stereoscopic Atlas of Macular Diseases, Diagnosis and Treatment.** St Louis: Mosby, 1997.

GENBANK. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> >.

GRAFF, C.; ERIKSSON, A.; FORSMAN, K.; SANDGREN, O.; HOLMGREN, G.; WADELIUS, C. **Refined genetic localization of the Best disease gene in 11q13 and physical mapping of linked markers on radiation hybrids.** Human Genetics, v. 101, p. 263-270, 1997.

GRAFF, C. et al. **Fine mapping of Best's macular dystrophy localizes the gene in close proximity to but distinct from the D11S480/ROM1 loci.** Genomics, v. 24, n. 3, p. 425-34, Dec 1994.

GUZIEWICZ, K. E.; SLAVIK, J.; LINDAUER, S. J. P.; AGUIRRE, G. D.; ZANGERL, B. **Molecular consequences of BEST1 gene mutations in canine multifocal retinopathy predict functional implications for human bestrophinopathies.** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 52, p. 4497-4505, 2011.

- GUZIEWICZ, K. E. et al. **Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease.** Invest Ophthalmol Vis Sci, v. 48, n. 5, p. 1959-67, May 2007.
- HARTZELL, C.; QU, Z.; PUTZIER, I.; ARTINIAN, L.; CHIEN, L. T.; CUI, Y. **Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration.** Physiology (Bethesda), v. 20, p. 292-302, Oct 2005.
- HARTZELL, H. C.; QU, Z.; YU, K.; XIAO, Q.; CHIEN, L.-T. **Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies.** Physiological reviews, v. 88, p. 639-672, 2008.
- HOU, Y. C. et al. **Linkage study of Best's vitelliform macular dystrophy (VMD2) in a large North American family.** Human Heredity, v. 46, n. 4, p. 211-20, Jul-Aug 1996.
- IANNACCONE, A.; KERR, N. C.; KINNICK, T. R.; CALZADA, J. I.; STONE, E. M. **Autosomal recessive best vitelliform macular dystrophy: report of a family and management of early-onset neovascular complications.** Archives of Ophthalmology, v. 129, n. 2, p. 211-7, Feb 2011.
- JOHNSON, A. A. et al. **Differential effects of best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking.** Human Molecular Genetics, v. 22, p. 4688-4697, 2013.
- KAY, C. N. et al. **Three-dimensional Distribution of the Vitelliform Lesion, Photoreceptors, and Retinal Pigment Epithelium in the Macula of Patients With Best Vitelliform Macular Dystrophy.** Archives of Ophthalmology, v. 130, p. 357-364, 2012.
- KINNICK, T. R. et al. **Autosomal recessive vitelliform macular dystrophy in a large cohort of vitelliform macular dystrophy patients.** Retina v. 31, p. 581-595, 2011.
- KRÄMER, F. et al. **Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration.** European journal of human genetics : EJHG, v. 8, p. 286-292, 2000.
- KRANJC, A. et al. **Regulation of bestrophins by Ca²⁺: a theoretical and experimental study.** PLoS One, v. 4, n. 3, p. e4672, 2009.

- KUO, Y.-H.; ABDULLAEV, I. F.; HYZINSKI-GARCÍA, M. C.; MONGIN, A. A. **Effects of alternative splicing on the function of bestrophin-1 calcium-activated chloride channels.** The Biochemical journal, v. 458, p. 575-83, 2014.
- LEE, S. et al. **Channel-mediated tonic GABA release from glia.** Science (New York, N.Y.), v. 330, p. 790-796, 2010.
- LOTERY, A. J. et al. **Allelic variation in the VMD2 gene in best disease and age-related macular degeneration.** Invest Ophthalmol Vis Sci, v. 41, n. 6, p. 1291-6, May 2000.
- LOVD. University of Regensburg. Disponível em: <www.huge.uniregensburg.de/BEST1_database/home.php?select_db=BEST1>. Acesso em: 05/02/2015.
- LOW, S. et al. **Autosomal dominant Best disease with an unusual electrooculographic light rise and risk of angle-closure glaucoma: a clinical and molecular genetic study.** Molecular vision, v. 17, p. 2272-2282, 2011.
- MACDONALD, I. M.; GUDISEVA, H. V.; VILLANUEVA, A.; GREVE, M.; CARUSO, R.; AYYAGARI, R. **Phenotype and Genotype of Patients with Autosomal Recessive Bestrophinopathy.** Ophthalmic Genetics, v. 33, p. 123-129, 2012.
- MARCHANT, D. et al. **Identification of novel VMD2 gene mutations in patients with best vitelliform macular dystrophy.** Human Mutation, v. 17, n. 3, p. 235, Mar 2001.
- MARCHANT, D. et al. **New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy.** Journal of medical genetics, v. 44, p. e70, 2007.
- MARMORSTEIN, A. D.; CROSS, H. E.; PEACHEY, N. S. **Functional roles of bestrophins in ocular epithelia.** Progress in Retinal and Eye Research, v. 28, p. 206-226, 2009.
- MARMORSTEIN, A. D.; MARMORSTEIN, L. Y.; RAYBORN, M.; WANG, X.; HOLLYFIELD, J. G.; PETRUKHIN, K. **Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 12758-12763, 2000.

- MARMORSTEIN, L. Y.; MCLAUGHLIN, P. J.; BRETT STANTON, J.; YAN, L.; CRABB, J. W.; MARMORSTEIN, A. D. **Bestrophin interacts physically and functionally with protein phosphatase 2A**. Journal of Biological Chemistry, v. 277, p. 30591-30597, 2002.
- MARMORSTEIN, L. Y. et al. **The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1)**. The Journal of general physiology, v. 127, p. 577-589, 2006.
- MARQUARDT, A.; STÖHR, H.; PASSMORE, L. A.; KRÄMER, F.; RIVERA, A.; WEBER, B. H. F. **Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease)**. Human Molecular Genetics, v. 7, p. 1517-1525, 1998.
- MASUDA, T.; ESUMI, N. **SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium**. Journal of Biological Chemistry, v. 285, p. 26933-26944, 2010.
- MILENKOVIC, V. M.; KREJCOVA, S.; REICHHART, N.; WAGNER, A.; STRAUß, O. **Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β -subunits: Identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus**. PLoS ONE, v. 6, 2011.
- MILENKOVIC, V. M.; LANGMANN, T.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K.; WEBER, B. H. F. **Molecular evolution and functional divergence of the bestrophin protein family**. BMC evolutionary biology, v. 8, p. 72, 2008.
- MILENKOVIC, V. M.; RIVERA, A.; HORLING, F.; WEBER, B. H. F. **Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane**. Journal of Biological Chemistry, v. 282, p. 1313-1321, 2007.
- MILENKOVIC, V. M.; SORIA, R. B.; ALDEHNI, F.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K. **Functional assembly and purinergic activation of bestrophins**. Pflugers Archives: European Journal of Physiology, v. 458, p. 431-441, 2009.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. Nucleic Acids Res, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988.

- MOHLER, C. W.; FINE, S. L. **Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy**. *Ophthalmology*, v. 88, n. 7, p. 688-92, Jul 1981.
- MUTATION TASTER. Disponível em: < <http://www.mutationtaster.org/> >. Acesso em: 25/02/2015.
- NAG, T. C.; WADHWA, S. **Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states**. *Micron*, v. 43, n. 7, p. 759-81, Jul 2012.
- NEUSSERT, R.; MÜLLER, C.; MILENKOVIC, V. M.; STRAU, O. **The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER**. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, v. 460, p. 163-175, 2010.
- NICHOLS, B. E.; BASCOM, R.; LITT, M.; MCINNES, R.; SHEFFIELD, V. C.; STONE, E. M. **Refining the locus for Best vitelliform macular dystrophy and mutation analysis of the candidate gene ROM1**. *American journal of human genetics*, v. 54, p. 95-103, 1994.
- NORDSTRÖM, S.; BARKMAN, Y. **Hereditary macular degeneration (HMD) in 246 cases traced to one gene-source in central Sweden**. *Hereditas*, v. 84, p. 163-176, 1977.
- O'GORMAN, S.; FLAHERTY, W. A.; FISHMAN, G. A.; BERSON, E. L. **Histopathologic findings in Best's vitelliform macular dystrophy**. *Archives of ophthalmology*, v. 106, p. 1261-1268, 1988.
- PETRUKHIN, K. et al. **Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy**. *Nature genetics*, v. 19, p. 241-247, 1998.
- POMARES, E.; BURÉS-JELSTRUP, A.; RUIZ-NOGALES, S.; CORCÓSTEGUI, B.; GONZÁLEZ-DUARTE, R.; NAVARRO, R. **Nonsense-mediated decay as the molecular cause for autosomal recessive bestrophinopathy in two unrelated families**. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 53, p. 532-537, 2012.
- PRIMER 3 PLUS. Disponível em: < <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> >.
- PRIMER BLAST. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> >. Acesso em: 25/01/2014.

- QU, Z.; CHENG, W.; CUI, Y.; CUI, Y.; ZHENG, J. **Human disease-causing mutations disrupt an N-C-terminal interaction and channel function of bestrophin 1**. Journal of Biological Chemistry, v. 284, p. 16473-16481, 2009.
- QU, Z.; CHIEN, L.-T.; CUI, Y.; HARTZELL, H. C. **The anion-selective pore of the bestrophins, a family of chloride channels associated with retinal degeneration**. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 26, p. 5411-5419, 2006.
- QU, Z.; HARTZELL, H. C. **Bestrophin Cl⁻ channels are highly permeable to HCO₃⁻**. American journal of physiology. Cell physiology, v. 294, p. C1371-C1377, 2008.
- QUERQUES, G. et al. **Functional and clinical data of Best vitelliform macular dystrophy patients with mutations in the BEST1 gene**. Molecular vision, v. 15, p. 2960-2972, 2009.
- RETINA INTERNACIONAL. Disponível em: < (<http://www.retina-international.org/sci-news/databases/mutation-database/best1-mutation/>). >. Acesso em: 21/01/2015.
- SATO, M. T. **Distrofia Retiniana Com Onda Rápida Escotópica (Drore) Associada À Síndrome Dos Cabelos Anágenos Frouxos**. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.
- SCHATZ, P.; KLAR, J.; ANDRÉASSON, S.; PONJAVIC, V.; DAHL, N. **Variant phenotype of Best vitelliform macular dystrophy associated with compound heterozygous mutations in VMD2**. Ophthalmic genetics, v. 27, p. 51-56, 2006.
- SCHUTT, F.; UEBERLE, B.; SCHNÖLZER, M.; HOLZ, F. G.; KOPITZ, J. **Proteome analysis of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells**. FEBS Letters, v. 528, p. 217-221, 2002.
- SEDDON, J. M. et al. **Assessment of mutations in the Best macular dystrophy (VMD2) gene in patients with adult-onset foveomacular vitelliform dystrophy, age-related maculopathy, and bull's-eye maculopathy**. Ophthalmology, v. 108, p. 2060-2067, 2001.
- SEDDON, J. M.; SHARMA, S.; CHONG, S.; HUTCHINSON, A.; ALLIKMETS, R.; ADELMAN, R. A. **Phenotype and genotype correlations in two best families**. Ophthalmology, v. 110, p. 1724-1731, 2003.

- SHAMSI, F. A.; BOULTON, M. **Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin.** Invest Ophthalmol Vis Sci, v. 42, n. 12, p. 3041-6, Nov 2001.
- SHARON, D. et al. **Ocular phenotype analysis of a family with biallelic mutations in the BEST1 gene.** American Journal of Ophthalmology, v. 157, p. 697-709.e2, 2014.
- SINGH, R. et al. **iPS cell modeling of best disease: Insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration.** Human Molecular Genetics, v. 22, p. 593-607, 2013.
- SODI, A. et al. **Ocular phenotypes associated with biallelic mutations in BEST1 in Italian patients.** Molecular vision, v. 17, p. 3078-87, 2011.
- SODI, A. et al. **BEST1 sequence variants in Italian patients with vitelliform macular dystrophy.** Molecular Vision, v. 18, p. 2736-2748, 2012.
- STÖHR, H.; MARQUARDT, A.; NANDA, I.; SCHMID, M.; WEBER, B. H. F. **Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family.** European journal of human genetics : EJHG, v. 10, p. 281-284, 2002.
- STONE, E. **BEST1 mutation.** [Mensagem pessoal]. Mensagem recebida por: <anaclaudiambraga@gmail.com>, em: 08/02/2015.
- STONE, E. M.; NICHOLS, B. E.; STREB, L. M.; KIMURA, A. E.; SHEFFIELD, V. C. **Genetic linkage of vitelliform macular degeneration (Best's disease) to chromosome 11q13.** Nature Genetics, v. 1, n. 4, p. 246-50, Jul 1992.
- SUN, H.; TSUNENARI, T.; YAU, K.-W.; NATHANS, J. **The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, p. 4008-4013, 2002.
- THS. The Health Science. Disponível em: <
<http://thehealthscience.com/showthread.php?843279-Best-Disease>>. Acesso em: 12/03/2015.
- TIAN, R.; YANG, G.; WANG, J.; CHEN, Y. **Screening for BEST1 gene mutations in Chinese patients with bestrophinopathy.** Molecular Vision, n. 20, p. 1594-1604, 2014.

- TSUNENARI, T.; NATHANS, J.; YAU, K. W. **Ca²⁺-activated Cl⁻ current from human bestrophin-4 in excised membrane patches**. J Gen Physiol, v. 127, n. 6, p. 749-54, Jun 2006.
- TSUNENARI, T. et al. **Structure-Function Analysis of the Bestrophin Family of Anion Channels**. Journal of Biological Chemistry, v. 278, p. 41114-41125, 2003.
- UNTERGASSER, A. et al. **Primer3--new capabilities and interfaces**. Nucleic Acids Res, v. 40, n. 15, p. e115, Aug 2012.
- VAUGHAN, D.; ASBURY, T.; RIORDAN-EVA, P. **OFTALMOLOGIA GERAL**. 15 ed. SÃO PAULO: ATHENEU, 2003.
- VISION VARIATION DATABASE. Disponível em: <
<http://vvd.eng.uiowa.edu/variant/1100?full>>. Acesso em: 21/01/2015.
- WABBELS, B.; PREISING, M. N.; KRETSCHMANN, U.; DEMMLER, A.; LORENZ, B. **Genotype-phenotype correlation and longitudinal course in ten families with Best vitelliform macular dystrophy**. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, v. 244, p. 1453-1466, 2006.
- WEINGEIST, T. A.; KOBRIN, J. L.; WATZKE, R. C. **Histopathology of Best's macular dystrophy**. Archives of ophthalmology, v. 100, p. 1108-1114, 1982.
- WHITE, K.; MARQUARDT, A.; WEBER, B. H. F. **VMD2 mutations in vitelliform macular dystrophy (Best disease) and other maculopathies**. Human Mutation, v. 15, p. 301-308, 2000.
- WOO, D. H. et al. **TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation**. Cell, v. 151, n. 1, p. 25-40, Sep 28 2012.
- XIAO, Q.; PRUSSIA, A.; YU, K.; CUI, Y.-Y.; HARTZELL, H. C. **Regulation of bestrophin Cl channels by calcium: role of the C terminus**. The Journal of general physiology, v. 132, p. 681-692, 2008.
- YANAGI, Y.; SEKINE, H.; MORI, M. **Identification of a novel VMD2 mutation in Japanese patients with Best disease**. Ophthalmic Genet, v. 23, n. 2, p. 129-33, Jun 2002.

- YARDLEY, J. et al. **Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC).** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 45, p. 3683-3689, 2004.
- YU, K.; QU, Z.; CUI, Y.; HARTZELL, H. C. **Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration.** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 48, p. 4694-4705, 2007.
- YU, K.; XIAO, Q.; CUI, G.; LEE, A.; HARTZELL, H. C. **The best disease-linked Cl-channel hBest1 regulates Ca V 1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains.** J Neurosci, v. 28, n. 22, p. 5660-70, May 28 2008.
- ZAGO, R. J. **Eletro-Oculograma como Método de Avaliação Anátomo-Funcional da Retina: Desenvolvimento de Padrão Normal para o Centro da Visão do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.** (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- ZHAO, L. et al. **A novel compound heterozygous mutation in the BEST1 gene causes autosomal recessive Best vitelliform macular dystrophy.** Eye, v. 26, p. 866-871, 2012.

11 ANEXOS

**PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA
HOSPITAL DE CLÍNICAS**



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ACHADOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DE DOENÇAS OFTALMOLÓGICAS HEREDITÁRIAS

Pesquisador: Mario Teruo Sato

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 24561313.3.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
Financiamento Próprio
Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 518.120

Data da Relatoria: 13/01/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer do CEP nº 475.459 de 26/11/2013.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer do CEP nº 475.459 de 26/11/2013.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer do CEP nº 475.459 de 26/11/2013.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer do CEP nº 475.459 de 26/11/2013.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atendida a recomendação do CEP, conforme solicitado no Parecer nº 492.684 de 17/12/2013.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

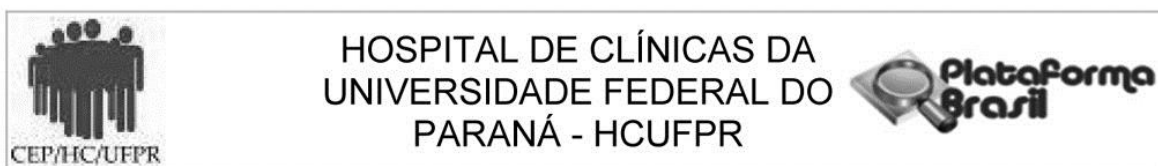
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 518.120

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendação atendida adequadamente, projeto considerado aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa. O pesquisador deve manter os documentos arquivados sob sua responsabilidade, pelo prazo de cinco anos após o término da pesquisa.

CURITIBA, 30 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR



Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---

Identificação

**Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do
Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná**
 Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 100
 Caixa Postal 19071, CEP 81530-900, Curitiba-PR
 Diretora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho
 Coordenador científico: Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos
 Fone/Fax (41) 3361-1729 ; Email: ligh@ufpr.br

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:
Informações para Participantes do Projeto Achados Clínicos e Genéticos de
Doenças Oftalmológicas Hereditárias**

Prezada senhora, prezado senhor,

nós, Mario Teruo Sato, Maria da Graça Bicalho, Pablo Sandro Carvalho Santos, Juliana da Silveira Schauren e Ana Claudia Gomes Torres, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná (UFPR), estamos convidando o(a) senhor(a), portador de doença oftalmológica, familiar ou voluntário para o grupo controle, a participar do estudo intitulado “Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias”.

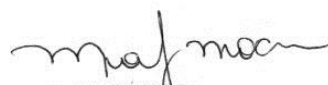
Este estudo está sendo conduzido em Curitiba, e tem o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da UFPR, juntamente com a clínica Retina e Vítreo Consultoria e o Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier como instituições responsáveis. Alguns passos do projeto serão conduzidos por alunos de pós-graduação do UFPR.

Resumo sobre genética e estudos genéticos:

Todas as pessoas carregam toda sua informação genética em cada célula do seu corpo. Esta informação genética serve de modelo para o funcionamento de todas as nossas células e está presente sob a forma de um ácido chamado DNA. As pequenas sequências que compõem o DNA são os genes do genoma humano, que contém cerca de 30.000 genes. Com base em estudos anteriores, temos razões para supor que alterações em certos genes envolvidos com a visão possam causar doenças ou síndromes que afetem os olhos.

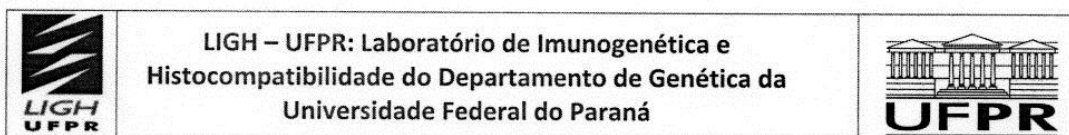
Objetivo e duração deste trabalho:

Este estudo vai investigar se as pessoas que possuem alterações em determinados genes são mais propensas a ter certas doenças que afetam os olhos com o objetivo de aumentar o conhecimento das bases genéticas das doenças oftalmológicas hereditárias e contribuir para o avanço científico. O estudo começou em maio de 2013 e tem fim previsto para 2023, podendo ser prorrogado por mais 5 anos caso haja necessidade.


MARIA JOSÉ M. DE ALMEIDA
 Membro do Comitê de Ética em Pesqui.
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____



Caso você participe da pesquisa, será necessário:

Responder ao questionário que será aplicado pelos pesquisadores e doar uma amostra de sangue (10 mL). A coleta de sangue será realizada uma única vez, neste local, após o esclarecimento de eventuais dúvidas, a leitura e a assinatura deste documento. É possível que o(a) senhor(a) experimente algum desconforto, devido à dor pela picada da agulha utilizada para a coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer mas que não causam dano.

Se o(a) senhor(a) é paciente ou familiar, também poderá ser convidado a realizar os exames oftalmológicos e dermatológicos necessários para estabelecer um diagnóstico, caso este ainda não tenha sido feito. Estes exames serão realizados na clínica Retina e Vítreo Consultoria (Rua Mateus Leme, 2285, Centro Cívico, Curitiba), no Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier (R. Quintino Bocaiúva, 329, Cabral, Curitiba) ou no Hospital de Clínicas da UFPR (R. Gen. Carneiro, 181 - Alto da Glória, Curitiba). É possível que o(a) senhor(a) experimente algum desconforto decorrente dos exames oftalmológicos, em especial do uso da lente de contato rígida no exame do eletrorretinograma. Além disso, há risco de efeitos colaterais relacionados ao uso de colírios dilatadores da pupila e do corante fluoresceína.

Seus dados pessoais:

Neste estudo, fotografias e dados pessoais que lhe dizem respeito serão coletados. Estes dados ficarão acessíveis somente para os membros deste projeto de pesquisa que assinam este documento. Ao longo de todo o estudo, a confidencialidade dos seus dados será estritamente mantida. Seu nome não aparecerá de modo algum em relatórios ou publicações decorrentes deste estudo. Seu sangue será descartado imediatamente após a extração do DNA. Seu DNA será usado exclusivamente para o propósito deste estudo.

Outras considerações:

As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Pessoas de contato:

Durante todo o tempo de atividade deste projeto de pesquisa, você pode esclarecer dúvidas ou pedir mais informações contactando uma ou mais das seguintes pessoas:

Dr. Mário Sato (médico oftalmologista, sato.mario@gmail.com, telefone: 041 9979-9588) ou Dr. Pablo S. Carvalho Santos (coordenador científico do LIGH, pablo.ligh@gmail.com, telefone: 99077102) ou


Sra. Juliana Schauben (doutoranda, julianaschauben@gmail.com, telefone: 041 9784-9155) ou Sra. Ana Cláudia M. B. G. Torres (mestranda, anaclaudiambraga@gmail.com, telefone: 041 8821-7914) ou

Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho (diretora do LIGH, ligh@ufpr.br, telefone: 041 3361-1546).

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - CEP do Hospital de Clínicas/UFPR (Rua General Carneiro, 181 - Curitiba/PR. Telefone: 041 3360-1041).

Se o(a) senhor(a) não tem mais nenhuma pergunta, e concorda em participar desta pesquisa, por favor rubrique todas as folhas deste documento e assine uma cópia do Termo de Consentimento. O(a) senhor(a) pode ficar com uma cópia do Termo e com uma cópia deste folheto informativo.

Em nome de todos os membros do projeto, muito obrigado ☺


MARIA JOSE M. B. G. TORRES
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HCL
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:
Achados Clínicos e Genéticos de Doenças Oftalmológicas Hereditárias

Com este documento, eu,

Nome e sobrenome

_____/_____/_____
Data de Nascimento

RG ou CPF

() _____, () _____, _____ @ _____
telefone fixo telefone celular E-mail

declaro que estou disposto(a) a participar voluntariamente da investigação científica citada acima. **Eu** fui informado(a) sobre o projeto "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias", e não tenho dúvidas a respeito do mesmo. **Eu** fui informado(a) oralmente e por escrito sobre o significado, os objetivos e os riscos associados às pesquisas e coletas de material biológico para o projeto. **Eu** tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas sobre o projeto e sobre o tratamento que será dado às minhas amostras e informações pessoais. **Eu** li as informações presentes neste termo de consentimento, compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar e recebi uma cópia do mesmo. **Eu** estou ciente da minha possibilidade de anular o meu consentimento a qualquer momento. Dessa forma, as informações coletadas sobre mim e meu material biológico coletado serão prontamente descartados. **Eu** entendo que os meus dados pessoais e minhas amostras biológicas estão sob a responsabilidade do laboratório LIGH da Universidade Federal do Paraná.

_____/_____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura da(o) participante da pesquisa

Para uso da equipe de pesquisa



Declaro ter informado por escrito e oralmente o participante (ou representante legal) do estudo "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias" sobre as consequências e os riscos associados às pesquisas, tendo-lhe dado uma cópia deste termo de consentimento e ter obtido voluntariamente seu consentimento.

_____/_____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura do membro do projeto de pesquisa


MARIA JOSE M.
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HCUFPR
 Matrícula 7462

TERMO DE ASSENTIMENTO

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---



Identificação

**Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do
Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná**

Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 100
Caixa Postal 19071, CEP 81530-900, Curitiba-PR

Diretora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho

Coordenador científico: Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos

Fone/Fax (41) 3361-1729 ; Email: ligh@ufpr.br

Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido
(para participantes da pesquisa menores de 18 anos)

Título do Projeto: Achados Clínicos e Genéticos de Doenças Oftalmológicas Hereditárias

Investigadores: Mario Teruo Sato, Maria da Graça Bicalho, Pablo Sandro Carvalho Santos, Juliana da Silveira Schauren e Ana Claudia Gomes Torres.

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de crianças ou adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.


INFORMAÇÃO AO PACIENTE:

O que é uma pesquisa?

Pesquisa é um conjunto de ações que visam a descoberta de novos conhecimentos em uma determinada área.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de:

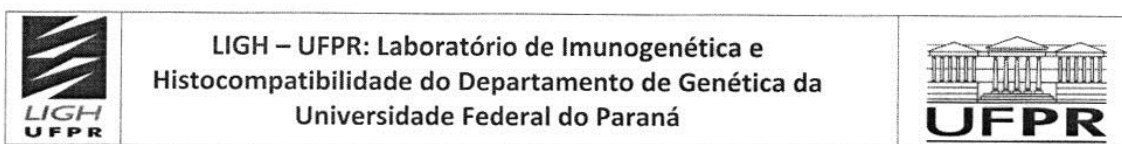
investigar se as pessoas que possuem alterações em determinados genes (partes do nosso DNA que determinam como vamos ser) têm tendência a ter certas doenças que afetam os olhos.


MARIA JOSE M.
 Membro do Comitê de Ética
 em Seres Humanos do LIGH
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____



Para que fazer a pesquisa?

Para aumentar o conhecimento dos genes que podem causar doenças nos olhos e contribuir para o avanço da ciência.

Como a pesquisa será feita?

Se você quiser participar desta pesquisa, você deverá preencher um questionário e depois iremos coletar uma pequena amostra de sangue do seu braço, uma única vez. Você vai sentir uma picada parecida com picada de mosquito. Utilizaremos esta amostra para estudar seus genes que estão presentes nas células do seu sangue. Se você ou seus familiares tiverem alguma doença nos olhos, vamos pedir que você vá, acompanhado de seus pais ou um adulto responsável à clínica oftalmológica em Curitiba, para fazer alguns exames nos olhos.

Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

Entender mais sobre os genes que causam doenças nos olhos.

Que você deve fazer se concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você aceite participar, deverá rubricar todas as folhas deste termo e assinar no final. Após a assinatura, iremos fazer a coleta de sangue explicada acima.

Seu nome não será divulgado em lugar algum. Apenas os pesquisadores poderão saber que a amostra colhida é sua. Mais ninguém terá acesso à sua amostra e a seus dados coletados.

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar, nós descartaremos as suas amostras, sem nenhuma consequência ou prejuízo a você.

Contato para dúvidas:

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe através dos telefones de contato a seguir: Mario Sato (041 3018-3063, 3078-4800 ou 9979-9588), Maria da Graça Bicalho (041 3361-1729), Juliana Schauren (041 3361-1729 ou 9266-3331), Ana Cláudia Torres (041 3361-1729 ou 8821-7914) ou Pablo Carvalho Santos (041 3361-1729 ou 9707-7102).

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante da pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP (Rua General Carneiro, 181 - Curitiba/PR. Telefone: (041) 3360-1041).



Em nome de todos os membros do projeto, muito obrigado! ☺


MARIA JOSE M.
 Membro do Comitê de Ética
 em Seres Humanos do HU
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa/ responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem precisar dar uma razão. **Eu** concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito descrito acima.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma via original assinada, rubricada e datada deste Documento de ASSENTIMENTO INFORMADO.

Nome do(a) menor de 18 anos

____/____/_____
Data de Nascimento

RG ou CPF

____, ____/____/_____
Cidade e data de hoje


Assinatura do(a) menor de 18 anos

Para uso da equipe de pesquisa



Declaro ter informado por escrito e oralmente o participante (ou representante legal) do estudo "Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias" sobre as consequências e os riscos associados às pesquisas, tendo-lhe dado uma cópia deste termo e ter obtido voluntariamente seu assentimento.

____, ____/____/_____
Cidade e data de hoje

Assinatura do membro do projeto de pesquisa


MARIA JOSE M. M.
 Membro do Comitê de Ética
 em Seres Humanos do Hospital
 Matricula 7462

QUESTIONÁRIO

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---

**Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do
Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná**

Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 100

Caixa Postal 19071, CEP 81530-900, Curitiba-PR

Diretora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho

Coordenador científico: Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos

Fone/Fax (41) 3361-1729 ; Email: ligh@ufpr.br

Identificação

Nome

**Questionário para o Projeto de Pesquisa:
Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas**


Prezada senhora, prezado senhor,



Nós agradecemos pelo seu interesse em participar na nossa pesquisa! Este questionário é parte do projeto intitulado “Achados clínicos e genéticos de doenças oftalmológicas hereditárias” que tem como objetivo a descoberta das bases genéticas de várias doenças e síndromes que afetam os olhos. Este estudo está sendo conduzido em Curitiba, e tem o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, juntamente com a clínica Retina e Vítreo Consultoria e o Centro Hospitalar de Reabilitação Ana Carolina Moura Xavier como instituições responsáveis. Alguns passos do projeto serão conduzidos por alunos de pós-graduação do UFPR.

Por favor responda o questionário seguindo a ordem das perguntas. Pule uma pergunta apenas nos casos em que uma seta pedir para que você faça isso.

Caso você deseje fazer algum comentário ou sugestão, você encontrará espaço para isso no final do questionário. Quando tiver respondido a todas as perguntas, por favor devolva o questionário à pessoa responsável.

Em nome de todos os membros do projeto, muito obrigado! ☺


MARIA JOSE MOELLEN
 Membro do Comitê de Ética em Pesqui.
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Matrícula 7462

	LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná	
---	---	---

01. Em que mês de que ano você nasceu?

Mês do ano de

02. De qual região da Terra vem a sua família (ou seus antecedentes)? *Aqui, várias respostas são possíveis. Marque um (X) na(s) resposta(s) correta(s)*


- () Europa (Branços)
 () Países Árabes (Branços)
 () África (Negros)
 () América do Sul (Indígenas)
 () Ásia (Orientais)
 () Outro:




03. Você é

- () Uma mulher  () Um homem 

04. Você é paciente de distrofia retiniana?

☐ Sim  Continuar com pergunta 7
☐ Não



05. Você é PARENTE de um paciente de distrofia retiniana?

☐ Sim  Fim do questionário.
☐ Não

06. Qual o seu grau de parentesco com a ou o paciente de distrofia retiniana?

07. Que tipo de distrofia foi diagnosticada?

Handwritten signature

	<p>LIGH – UFPR: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná</p>	
---	---	---

08. Quais são os principais sintomas que você ou seu parente apresentam? *Aqui você deve responder todos os sintomas relacionados à visão (dificuldade, nistagmo, estrabismo, etc), à pele (quantidade de pelos, problemas no cabelo), a malformações congênitas (polidactilia, ectrodactilia, fenda palatina, etc) e a outros sintomas que você lembre.*

09. Quando estes sintomas apareceram? *De preferência citar a idade de surgimento.*

10. Se você tiver mais alguma observação, poderá utilizar o espaço abaixo para escrever.

Agora o(a) pesquisador(a) irá fazer algumas perguntas sobre sua família.

2

E-mail com a informação dada pelo Sr. Edwin Stone (Universidade de Iowa)

Ana Cláudia Gomes Torres <anaclaudiambraga@gmail.com>
Para: edwin-stone@uiowa.edu

8 de fevereiro de 2015 10:15

Dear Mr.Stone

I'm Ana Cláudia Gomes Torres.

I am pursuing my master's degree in genetics and my work is about vitelliform macular dystrophy.

I analyzed the BEST1 gene and found the mutation (Asp304Asn c.910 G> A) in the retina of the international database this mutation is related to a paper of your research group.

I would like if in your work really found this mutation. I also noticed that this mutation is in the vision database University of Iowa where you work.

Please can give more information about this mutation?

Thank you so much

Best regards

Ana Cláudia Gomes Torres
Department of Genetics
Universidade Federal do Paraná (Curitiba/Paraná/Brazil)

Edwin Stone <stonee@zeus.eng.uiowa.edu>
Para: Ana Cláudia Gomes Torres <anaclaudiambraga@gmail.com>

8 de fevereiro de 2015 16:57

We have only observed this variant in one individual. A 5 year old patient with clinical findings suggestive of Best disease (sent to us from another institution for genetic testing).

Regards,

Ed

12 ARTIGO

Artigo em fase de preparação para submissão à revista *Molecular Vision*

Análise do gene *BEST1* em pacientes brasileiros com ascendência europeia portadores da Distrofia Macular Viteliforme Best

TORRES, ACG¹; SCHAUREN, JS¹.; SANTOS, PSC¹; SHIOKAWA, N³; SATO², MT; BICALHO, MG¹

1 Departamento de Genética – Universidade Federal do Paraná

2 Departamento de Oftalmologia Universidade Federal do Paraná

3 Clínica Retina e Vítreo

Objetivo: investigar o gene *BEST1* em pacientes e familiares. Observar o padrão de herança e segregação das mutações encontradas.

Métodos: participaram do estudo 9 pacientes e 16 familiares pertencentes a 4 famílias não aparentadas. As amostras de sangue foram coletadas para realizar a extração do DNA e a análise das mutações foi realizada por meio da técnica *SBT* (*Sequence Base Typing*). Foram sequenciados 10 éxons do gene *BEST1*.

Resultados: foram identificadas ao todo 4 mutações de sentido trocado, em 6 pacientes. Na família 1 foram identificadas as mutações Leu134Val e Arg141His; na família 2 a mutação Arg218His e na família 3 a mutação Asp304Asn. Apenas em uma família não foi observada nenhuma mutação na região codificante.

Conclusões: as mutações encontradas já haviam sido relatadas previamente. Pode-se observar padrões de herança recessivos e dominantes e também a importância da correlação fenótipo e genótipo.

INTRODUÇÃO

A Distrofia Macular Viteliforme Best (DMVB MIM 153700) é uma distrofia macular autossômica dominante caracterizada pelo acúmulo de lipofusina no EPR abrangendo a área macular. Ocasionalmente uma lesão na mácula conhecida como em formato de gema de ovo (viteliforme). Outra característica comum é a diminuída razão entre pico claro/escuro do eletro-oculograma (EOG) (1, 2).

O gene responsável pela doença é o *BEST1* localizado no cromossomo 11 (11q12.3)(3, 4) que codifica uma proteína com 585 aminoácidos, bestrofina-1, prevista para ser um canal de Cl^- ativado por cálcio e/ou modulador da atividade de canal de Ca^{2+} (5). Entretanto a exata função ainda é desconhecida. Desde a descoberta do gene por Petrukhin et al., 1998 e Marquardt et al., 1998, aproximadamente 200 mutações, foram descritas em pacientes portadores de DMVB e também outros transtornos como vitreocoroideopatia autossômica dominante (MIM 193220)(6), distrofia macular viteliforme do adulto (MIM 608161)(7), retinose pigmentar (RP50 MIM 613194)(8) e bestrofinopatia autossômica recessiva (MIM 611809)(9). Em torno de 90% são de sentido trocado (missense), mas foram identificadas também mudança de matriz de leitura (frameshift) e inserções e deleções que não alteram a matriz de leitura (inframe)(10). O presente trabalho realizou sequenciamento direto de 4 famílias brasileiras com portadores da DMVB. Foram encontradas 4 mutações de sentido trocado Leu134Val; Arg141His; Arg218His e Asp304Asn em 6 pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

A amostra é constituída de 4 famílias brasileiras euro-descentes com pelo menos um indivíduo diagnosticado com DMVB. Os pacientes são provenientes da clínica Retina e Vítreo Consultoria. O estudo foi realizado com a aprovação do comitê de ética do Hospital das Clínicas. O termo de consentimento foi assinado por todos os participantes.

Métodos moleculares

O DNA foi extraído a partir de amostra de sangue da qual foi separado a camada de células mononucleares e realizada a extração pela técnica de Miller (1988) modificada (11).

Foi realizada a amplificação por PCR dos éxons 1, 3 ao 11. Os primers utilizados na amplificação dos éxons 1, 3, 5, 6, 7, 10 e 11 foram projetados por nós e os éxons 4, 8 e 9 foram previamente descritos (12). Os produtos de PCR foram

purificados e após a reação de sequenciamento (utilizando o kit de sequenciamento *Big Dye® v. 3.1 Life Technologies*), precipitados com etanol e analisados no *ABI Prism 3130 (Applied Biosystems)*. Os eletroferogramas gerados foram visualizados no programa *Sequencing Analysis (Applied Biosystems)* e interpretados no programa *SeqScape v.2.6 (Applied Biosystems)*.

RESULTADOS

Família 1: Paciente (II-1) com mutação bialélica Leu134Val e Arg141His. O pai da paciente (I-1) é portador da mutação Leu134Val e sua mãe (I-2) é portadora da mutação Arg141His. Como pode ser visto visualizado na **Figura 1**.

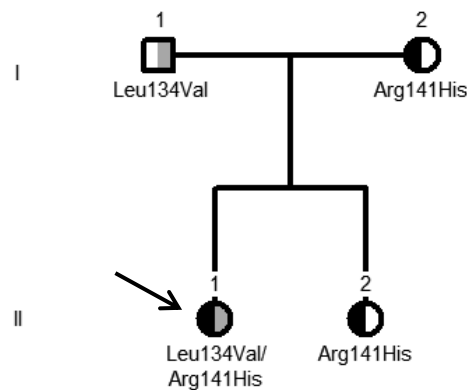


Figura 1: Heredograma caso 1.

A seta está indicando o paciente

Família 2: O paciente (II-3) apresentou a mutação c.653G>A que leva a alteração proteica p.Arg218His. Seu pai (I-1) e seus dois irmãos (II-1 e II-2) também possuem, como mostra a **Figura 2**.

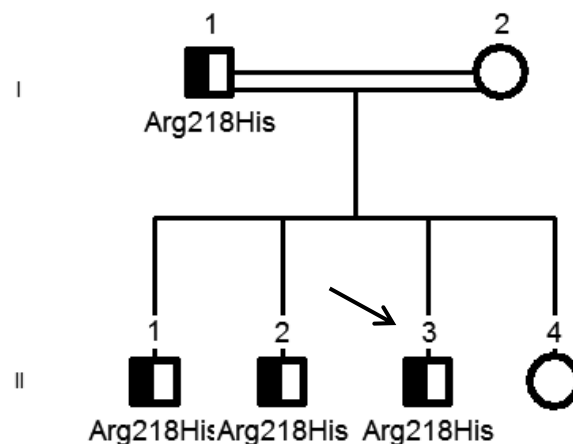


Figura 2 Heredograma família 2. A seta está indicando o probando.

Família 3: Os pacientes I-1, II-1, II-2 e II-3 apresentam a mutação c.910G>A Asp304Asn (**Figura 3**).

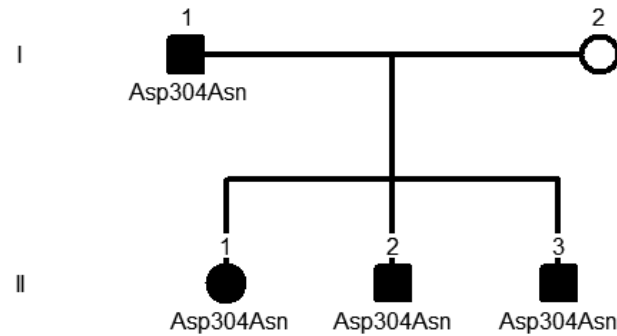


Figura 3 Heredograma família 3.

DISCUSSÃO

Família 1 revela um caso de mutação bialélica (Arg141His e Leu134Val) na paciente (II-1). Seus pais (I-1 e I-2) e irmã (II-2) são portadores de apenas de uma ou outra mutação e não apresentam sinais clínicos da doença. Este caso contraria o padrão dominante que é visto normalmente em DMVB. Em trabalhos recentes foram relacionados casos de heterozigotos compostos com casos de BAR (bestrofinopatia autossômica recessiva)(9, 13-16). A mutação presente na paciente Arg141His também foi relatada em casos de BAR associada com outra variante (13, 16, 17). A paciente apresenta EOG anormal (índice Arden 1,0), entretanto não apresenta fundo de olho compatível com lesão viteliforme. Baseando-se nas evidências, é possível que a paciente seja portadora de BAR e não DMVB. Provavelmente seus pais não apresentam a doença, porque o alelo normal compensa a falta da produção da proteína do alelo mutante. Como confirmado por Burgess e colaboradores(9) que em estudo de expressão em células HEK co-expressou a proteína mutante Arg141His e a proteína normal e revelou que esta mutação associada ao alelo selvagem produziu canais normais e, portanto funcionais. A mutação Leu134Val encontrada por Marchant e colaboradores não foi testada para o potencial patogênico(18).

Família 2 paciente portador da mutação Arg218His (II-3), herdada de seu pai (I-1) juntamente com seus 2 irmãos (II-1 e II-2). Esta mutação foi relatada primeiramente

por Lotery e colaboradores (19), posteriormente encontrada por Marchant e colaboradores (20) este último trabalho sugere que esta variante pode ser responsável pela variedade fenotípica dentro das famílias, como visto no presente estudo. Tal penetrância incompleta observada neste caso, pode se dar devido à ação de outros fatores, como genes modificadores(21). O paciente apresenta fundo de olho com alterações da DMVB e EOG anormal (índice Arden 1,5). Os seus familiares não foram avaliadas através de exames oftalmológicos, não é possível afirmar que não existam pequenas alterações.

Família 3 nesta família o pai (I-1) e seus 3 filhos (II-1, II-2 e II-3) são portadores de DMVB, caracterizando o padrão dominante clássico. A mutação encontrada, Asp304Asn, descrita está indexada na base de dados Universidade de Iowa e na Retina Internacional. Segundo Edwin Stone (informação pessoal) esta mutação foi encontrada em apenas um único indivíduo. Tal aminoácido mutado é localizado no Ca^{2+} *clasp* (22) e mutações nesta região (aminoácido 301 e 304) são relatadas por prejudicar a função do canal (23-25). O EOG não está disponível para esta família.

CONCLUSÃO

As mutações encontradas possivelmente tenham um efeito patogênico. Mais estudos são necessários para caracterização das mutações relacionadas à DMVB em pacientes brasileiros. Diferentes padrões de herança foram observados nas 3 famílias portadoras de mutações na região codificante: na família 1, o provável padrão de herança é o recessivo, sendo a paciente heterozigota composta; na família 3 padrão autossômico dominante, entretanto na família 2 pode-se observar penetrância incompleta. As mutações observadas no presente estudo já tinham sido descritas anteriormente em bases de dados genéticos relacionados a alterações visuais (*Vision Mutation Database*). No que se refere a família 1 nossos resultados auxiliaram com a avaliação clínica do paciente uma vez que a caracterização da mutação permitiu alterar o diagnóstico de DMVB para bestrofinopatia autossômica recessiva, criando desta forma correlação mais acurada genótipo-fenótipo. Este é o primeiro estudo brasileiro que analisou o gene BEST1 em pacientes com DMVB.

Referências Bibliográficas

1. Deutman aF. Electro-oculography in families with vitelliform dystrophy of the fovea. Detection of the carrier state. *Archives of ophthalmology*. 1969;81:305-16. PubMed PMID: 5774285.
2. Arden GB, Barrada a, Kelsey JH. New clinical test of retinal function based upon the standing potential of the eye. *The British journal of ophthalmology*. 1962;46:449-67. PubMed PMID: 18170802.
3. Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, et al. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nature genetics*. 1998;19:241-7. PubMed PMID: 9662395.
4. Marquardt A, Stöhr H, Passmore La, Krämer F, Rivera A, Weber BHF. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Human molecular genetics*. 1998;7:1517-25. PubMed PMID: 9700209.
5. Sun H, Tsunenari T, Yau K-W, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:4008-13. PubMed PMID: 11904445.
6. Yardley J, Leroy BP, Hart-Holden N, Lafaut Ba, Loeys B, Messiaen LM, et al. Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2004;45:3683-9. PubMed PMID: 15452077.
7. Allikmets R, Seddon JM, Bernstein PS, Hutchinson a, Atkinson a, Sharma S, et al. Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. *Human genetics*. 1999;104:449-53. PubMed PMID: 10453731.
8. Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N, et al. Missense Mutations in a Retinal Pigment Epithelium Protein, Bestrophin-1, Cause Retinitis Pigmentosa. *American journal of human genetics*. 2009;85:581-92. PubMed PMID: 19853238.
9. Burgess R, Millar ID, Leroy BP, Urquhart JE, Fearon IM, De Baere E, et al. Biallelic Mutation of BEST1 Causes a Distinct Retinopathy in Humans. *American journal of human genetics*. 2008;82:19-31. PubMed PMID: 18179881.
10. Boon CJF, Theelen T, Hoefsloot EH, van Schooneveld MJ, Keunen JEE, Cremers FPM, et al. Clinical and molecular genetic analysis of best vitelliform macular dystrophy. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2009;29:835-47. PubMed PMID: 19357557.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988 Feb 11;16(3):1215. PubMed PMID: 3344216. Pubmed Central PMCID: PMC334765. Epub 1988/02/11. eng.
12. Low S, Davidson AE, Holder GE, Hogg CR, Bhattacharya SS, Black GC, et al. Autosomal dominant Best disease with an unusual electrooculographic light rise and risk of angle-closure glaucoma: a clinical and molecular genetic study. *Molecular vision*. 2011;17:2272-82. PubMed PMID: 21921978.
13. Schatz P, Klar J, Andréasson S, Ponjavic V, Dahl N. Variant phenotype of Best vitelliform macular dystrophy associated with compound heterozygous mutations in VMD2. *Ophthalmic genetics*. 2006;27:51-6. PubMed PMID: 16754206.
14. Tian R, Yang G, Wang J, Chen Y. Screening for BEST1 gene mutations in Chinese patients with bestrophinopathy. *Molecular Vision*. 2014 (20):1594-604.
15. Cascavilla ML, Querques G, Stenirri S, Battaglia Parodi M, Querques L, Bandello F. Unilateral vitelliform phenotype in autosomal recessive bestrophinopathy. *Ophthalmic research*. 2012;48:146-50.
16. Iannaccone A, Kerr NC, Kinnick TR, Calzada JI, Stone EM. Autosomal recessive best vitelliform macular dystrophy: report of a family and management of early-onset neovascular complications. *Archives of ophthalmology*. 2011 Feb;129(2):211-7. PubMed PMID: 21320969. Epub 2011/02/16. eng.

17. Kinnick TR, Mullins RF, Dev S, Leys M, Mackey Da, Kay CN, et al. Autosomal recessive vitelliform macular dystrophy in a large cohort of vitelliform macular dystrophy patients. *Retina* (Philadelphia, Pa). 2011;31:581-95. PubMed PMID: 21273940.
18. Marchant D, Yu K, Bigot K, Roche O, Germain a, Bonneau D, et al. New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy. *Journal of medical genetics*. 2007;44:e70. PubMed PMID: 17287362.
19. Lotery AJ, Munier FL, Fishman GA, Weleber RG, Jacobson SG, Affatigato LM, et al. Allelic variation in the VMD2 gene in best disease and age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000 May;41(6):1291-6. PubMed PMID: 10798642. Epub 2000/05/08. eng.
20. Marchant D, Gogat K, Boutboul S, Péquignot M, Sternberg C, Dureau P, et al. Identification of novel VMD2 gene mutations in patients with best vitelliform macular dystrophy. *Human mutation*. 2001;17:235. PubMed PMID: 11241846.
21. Yu K, Qu Z, Cui Y, Hartzell HC. Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2007;48:4694-705. PubMed PMID: 17898294.
22. Dickson VK, Pedi L, Long SB. Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel. *Nature*. 2014 Dec 11;516(7530):213-8. PubMed PMID: 25337878.
23. Tsunenari T, Nathans J, Yau KW. Ca²⁺-activated Cl⁻ current from human bestrophin-4 in excised membrane patches. *The Journal of general physiology*. 2006 Jun;127(6):749-54. PubMed PMID: 16702355. Pubmed Central PMCID: PMC2151534. Epub 2006/05/17. eng.
24. Xiao Q, Prussia A, Yu K, Cui YY, Hartzell HC. Regulation of bestrophin Cl channels by calcium: role of the C terminus. *The Journal of general physiology*. 2008 Dec;132(6):681-92. PubMed PMID: 19029375. Pubmed Central PMCID: 2585866.
25. Qu Z, Chien L-T, Cui Y, Hartzell HC. The anion-selective pore of the bestrophins, a family of chloride channels associated with retinal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26:5411-9. PubMed PMID: 16707793.